

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor Prof. Dr. med. Jörg-Christian Tonn

und

aus dem Institut für Chirurgische Forschung der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Kommissarischer Direktor Prof. Dr. med. U. Pohl

Antagonisierung von Bradykinin-B₂-Rezeptoren

nach fokaler zerebraler Ischämie -

Therapeutisches Fenster bei der Ratte

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Benjamin Dominik Kläsner

aus

München

Jahr 2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. - Doz. Dr. med. N. Plesnila

Mitberichterstatter: Priv. - Doz. Dr. A. Faußner
Priv. - Doz. Dr. S. Kastenbauer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2006

1 INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|-----------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | INHALTSVERZEICHNIS | 3 |
| 2 | EINLEITUNG..... | 5 |
| 2.1 | ALLGEMEINES | 5 |
| 2.2 | THERAPIE..... | 7 |
| 2.2.1 | <i>Allgemeinmedizinische Behandlung</i> | 7 |
| 2.2.2 | <i>Rekanalisierende Therapie</i> | 10 |
| 2.2.3 | <i>Frühe Sekundärprophylaxe</i> | 11 |
| 2.2.4 | <i>Vorbeugung und Behandlung von Komplikationen</i> | 11 |
| 2.3 | KALLIKREIN-KININ-SYSTEM..... | 12 |
| 2.4 | STUDIENZIEL..... | 14 |
| 3 | MATERIAL UND METHODIK..... | 17 |
| 3.1 | MATERIAL | 17 |
| 3.2 | METHODIK..... | 17 |
| 3.2.1 | <i>Versuchstiere</i> | 17 |
| 3.2.2 | <i>Versuchsaufbau</i> | 17 |
| 3.2.3 | <i>Versuchsdurchführung</i> | 19 |
| 3.3 | STATISTIK | 26 |
| 4 | ERGEBNISSE..... | 27 |
| 4.1 | MORTALITÄT | 27 |
| 4.2 | PHYSIOLOGISCHE PARAMETER..... | 27 |
| 4.2.1 | <i>pH-Wert</i> | 27 |
| 4.2.2 | <i>pCO₂</i> | 28 |
| 4.2.3 | <i>pO₂</i> | 29 |
| 4.2.4 | <i>Sauerstoffsättigung</i> | 29 |
| 4.2.5 | <i>Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)</i> | 30 |
| 4.2.6 | <i>Rektale und temporale Körpertemperatur</i> | 30 |
| 4.3 | LASER-DOPPLER-FLOWMETRIE | 32 |
| 4.4 | INFARKTVOLUMINA | 34 |
| 4.4.1 | <i>Gesamtvolumen</i> | 34 |

| | | |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.4.2 | <i>Basalganglien</i> | 35 |
| 4.4.3 | <i>Kortex</i> | 35 |
| 4.4.4 | <i>Korrigiertes Infarktvolumen</i> | 36 |
| 4.5 | NEURO-SCORE | 38 |
| 4.6 | GEWICHT | 39 |
| 5 | DISKUSSION | 40 |
| 5.1 | EXPERIMENTELLES MODELL UND STUDIENDESIGN..... | 40 |
| 5.2 | EXPRESSION VON B ₂ -REZEPTOREN NACH ZEREBRALER ISCHÄMIE | 42 |
| 5.3 | LF 16-0687 Ms..... | 43 |
| 5.4 | PHARMAKOLOGISCHE BRADYKININ-B ₂ -REZEPTOR BLOCKADE | 43 |
| 5.5 | AUSBLICK | 44 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 46 |
| 7 | VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN | 48 |
| 8 | VERZEICHNIS DER TABELLEN | 49 |
| 9 | VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN | 50 |
| 10 | ANHANG | 51 |
| 10.1 | NIH STROKE SCALE | 51 |
| 10.2 | VERWENDETE MATERIALIEN, GERÄTE, SUBSTANZEN, PROGRAMME | 55 |
| 10.2.1 | <i>Verwendete Geräte</i> | 55 |
| 10.2.2 | <i>Chemikalien</i> | 55 |
| 10.2.3 | <i>Medikamente</i> | 56 |
| 10.2.4 | <i>Operationsmaterialien</i> | 56 |
| 10.2.5 | <i>Programme</i> | 57 |
| 10.2.6 | <i>Statistische Tests</i> | 57 |
| 11 | LITERATURVERZEICHNIS | 58 |
| 12 | LEBENS LAUF | 72 |
| 13 | DANKSAGUNG | 74 |

2 EINLEITUNG

2.1 Allgemeines

In den westlichen Industrienationen ist der akute zerebrale Insult die dritthäufigste Todesursache und die zweithäufigste Ursache für eine neurologisch bedingte Invalidität ^[3]. In den USA erleiden pro Jahr ca. 700.000 Menschen einen Schlaganfall ^[3], 8-12 % (ischämisch bedingt) bzw. 37-38% (hämorrhagisch bedingt) der Patienten versterben innerhalb der ersten 30 Tage nach dem Insult ^[3]. Der hohe Anteil an schweren und bleibenden Behinderungen führt in den betroffenen Familien zu einer starken psychischen, physischen und auch finanziellen Belastung. Momentane Schätzungen aus den USA ergeben einen Kostenaufwand von ca. 56,8 Milliarden Dollar ^[3] für die Behandlung von Schlaganfällen im Jahre 2005.

Der ischämische Schlaganfall ist eine Erkrankung der Blutgefäße des Zentralnervensystems, bei der es durch Sistieren der Blutversorgung zu einem Funktionsverlust und schließlich zum Absterben von Gehirngewebe kommt. Die meisten vaskulären Schäden des Gehirns sind durch Arteriosklerose oder Hypertonie bedingt. Die wichtigsten Formen zerebrovaskulärer Erkrankungen sind:

- zerebrovaskuläre Insuffizienz (vorübergehende Störungen des Blutflusses)
- hypertensive Enzephalopathie
- Infarkte (Embolie oder Thrombose der intra- oder extrakraniellen Gefäße)
- Blutungen einschließlich hypertensiver Parenchymblutungen und Subarachnoidalblutungen (kongenitaler Aneurysmen und arteriovenöse Malformationen, die Symptome einer Raumforderung, eines Infarktes oder einer Blutung verursachen können)

Zu unterscheiden sind grundsätzlich zwei Formen der zerebralen Ischämie, globale und fokale Ischämie. Gründe für eine globale Ischämie sind z. B. ein Herzstillstand, der zu einem kompletten Ausfall der zerebralen Blutversorgung führt. Bereits nach sechs bis acht Sekunden findet in der grauen Hirnsubstanz kein Stoffwechsel mehr statt. Es kommt zu ersten EEG - Veränderungen. Bewusstlosigkeit tritt nach zehn Sekunden auf und drei bis vier Minuten später ist die freie Glukose verbraucht. Bereits nach fünf

Minuten sind erste irreversible Schädigungen von Nervenzellen möglich. Eine globale Ischämie von über zehn Minuten führt in der Regel zum Hirntod ^[26; 49].

Im Gegensatz dazu steht die fokale Ischämie, bei der es nur in Teilbereichen des Gehirns zu Perfusionsdefiziten kommt. Diese Minderdurchblutung kann temporär oder permanent sein. Die Symptomatik des ischämischen Schlaganfalls richtet sich nach dem betroffenen Hirnareal und nicht unbedingt nach dem geschädigten Gefäß, da immer individuelle Unterschiede in der Blutversorgung vorliegen können. So kann ein Verschluss der Arteria cerebri media oder der Carotis interna beispielsweise die gleiche klinisch-neurologische Störung hervorrufen. Trotzdem folgt der zerebrale Schaden meistens einem recht spezifischen Muster der arteriellen Gefäßversorgung. Daher ist die Kenntnis der Gefäßverteilung extrem wichtig, um einen Schlaganfall von einem raumfordernden Prozess, wie er durch Hirntumor oder Abszess entsteht, zu unterscheiden.

2/3 aller Schlaganfallpatienten sind über 65 Jahre alt. Es handelt sich zu 85% um Schlaganfälle ischämischer Art. Davon sind 2/3 der Fälle thrombo-embolischer Genese, 20 % entstehen auf dem Boden einer hypertensiven Mikroangiopathie ^[3]. Die thrombo-embolischen Genese lässt sich wie folgt noch einmal aufgliedern:

- Kardial bedingt: 35 % Embolien
- Arteriosklerotisch bedingt: 25 % Thrombosen
- Hypertonus bedingt: 20 % Ischämien
- 20 % unbekannt

Als Risikofaktoren gelten:

- Nikotinabusus
- Herzrhythmusstörungen
- Diabetes mellitus
- Hypertonus
- Erhöhtes LDL-Cholesterin

2.2 Therapie

Die derzeit übliche Therapie setzt sich aus vier Bestandteilen zusammen:

- Behandlung allgemein-medizinischer Parameter wie Blutdruck und Körpertemperatur
- Spezifische Behandlung, rekanalisierende Therapie
- Frühe Sekundärprophylaxe
- Behandlung von Komplikationen

Zur einheitlichen Beurteilung von Schlaganfällen wurde eine NIH Stroke Scale entwickelt (Anhang 1). Hierbei werden Untersuchungen bezüglich des Bewusstseinsgrades, der Augenbewegung und des Gesichtsfeldes, der Motorik, einer Ataxie in den Extremitäten, der Sprache und dem Sprachverständnis, der Sensomotorik und dem Erkennen und Verstehen von Bildern und Wörtern durchgeführt. Die Ergebnisse ermöglichen dann eine entsprechende Zuordnung zum Schweregrad des Infarktes.

2.2.1 Allgemeinmedizinische Behandlung

Bei den meisten Schlaganfallpatienten stehen die akuten neurologischen Symptome im Vordergrund, Behandlung und Prognose werden aber von den Begleiterkrankungen des Patienten bestimmt. "Allgemeine Behandlung" bedeutet, optimale physiologische Parameter zu schaffen, um mit den spezifischen Behandlungen beginnen zu können. Die medizinische Versorgung umfasst die Behandlung des respiratorischen und kardialen Systems, den Ausgleich des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes, Blutdruckkontrolle und -behandlung sowie die Behandlung eines erhöhten intrakraniellen Druckes ^[1;5].

2.2.1.1 Respiratorische Funktion und Atemwegshygiene

Eine adäquate Oxygenierung des arteriellen Blutes ist für den Stoffwechsel des minderperfundierten Hirngewebes in der Randzone des Infarktes, der sogenannten

Penumbra, von entscheidender Bedeutung. Es liegen zwar keine gesicherten Daten aus prospektiven klinischen Studien vor, jedoch ist eine Oxygenierung über eine Nasensonde von 2-4 l/O₂/min zu empfehlen ^[5].

Sollten bereits pathologische Atemmuster z.B. nach Hirnstamm- und Hemisphäreninfarkten oder beim bewusstlosen Patienten mit dem Risiko der Entwicklung einer Aspirationspneumonie vorliegen, ist eine frühe endotracheale Intubation anzustreben ^[5]. Die 1-Jahr-Überlebensrate intubierter Schlaganfallpatienten ist mit ca. 30% höher, als aufgrund des schweren Krankheitsverlaufes zu erwarten wäre.

2.2.1.2 Kardiale Behandlung

Nicht selten kommt es nach Schlaganfällen zu kardialen Arrhythmien und Endstreckenveränderungen im EKG mit den Kriterien eines akuten Myokardinfarktes. Ebenso können nach einem Schlaganfall die Herzenzyme erhöht sein. Gelegentlich können akute Myokardinfakte auftreten, die klinisch kaum in Erscheinung treten und daher schwierig zu diagnostizieren sind. Ein EKG ist daher unverzichtbarer Bestandteil der Routinediagnostik bei Schlaganfallpatienten. Ein weiteres Ziel der Schlaganfallgrundversorgung ist die Optimierung der kardialen Auswurfleistung bei hoch-normalen systemischen Blutdruckwerten. Der zentrale Venendruck sollte bei etwa 8-10 cm H₂O liegen und gilt als wichtiger Bilanzierungsparameter für Volumenüberlastungen oder -defizienz, die beide ungünstige Effekte auf die zerebrale Perfusion haben. Das intravasale Volumen sollte stabil gehalten werden. Mit Hilfe inotroper Substanzen wie z.B. Dobutamin ist gegebenenfalls eine Verbesserung der kardialen Auswurfleistung zu erreichen, die zu einer erhöhten zerebralen Perfusion in Hirnarealen mit aufgehobener Autoregulation führen kann. Bei längerfristiger Anwendung dieser Substanzen ist eine ZVK-Anlage indiziert ^[5].

Die Behandlung von Herzrhythmusstörungen durch Medikamente, Kardioversion oder Herzschrittmacher sollte in der Regel in Zusammenarbeit mit Internisten oder Kardiologen erfolgen.

2.2.1.3 Blutdruckbehandlung

Da die Autoregulation des zerebralen Blutflusses in Infarktarealen oft aufgehoben ist und somit direkt vom systemischen Blutdruck abhängt, sollten Blutdruckabfälle möglichst vermieden werden. Eine leichte hypertensive Kreislauflage ist daher wünschenswert (160-180/90-100 mmHg). Mit einer Normalisierung des Blutdruckes kann nach ca. drei Tagen begonnen werden. Sollten raumfordernde Prozesse zu erwarten sein, ist damit allerdings noch zu warten, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung weiterhin zu gewährleisten. Da erhöhte Blutdruckwerte sich nach Schlaganfällen oftmals spontan in den ersten Wochen zurückbilden, ist eine Überprüfung der antihypertensiven Behandlungsindikation nach ca. vier Wochen durchzuführen. Die Indikation für eine Blutdrucksenkung in der Akutphase der zerebralen Ischämie besteht vor allem bei interkurrierenden Erkrankungen wie beim akuten Myokardinfarkt, bei der Herzinsuffizienz, beim akuten Nierenversagen oder bei der akuten hypertensiven Enzephalopathie. Blutdruckentgleisungen (systolisch über 220 mmHg, diastolisch über 120 mmHg) sollten jedoch medikamentös behandelt werden, wobei darauf zu achten ist, dass keine zu drastische Blutdrucksenkung vorgenommen wird ^[5].

2.2.1.4 Glukose-Stoffwechsel

Da eine Hyperglykämie für den weiteren Krankheitsverlauf ungünstig sein kann, sollte eine Behandlung ab einem Blutglukosespiegel von über 200 mg/dl konsequent durchgeführt werden. Das Senken des Blutzuckerspiegels sollte mit Alt-Insulin s.c. durchgeführt werden (z.B. 4IE bei BZ>200mg/dl, 6IE bei BZ>250mg/dl, 8IE bei BZ>300mg/dl). Die kontinuierliche Insulingabe mittels Perfusor (1-4 IE/h) ist in der Akutphase nur selten notwendig. Bis der Blutzucker bestimmt ist, dürfen einem Schlaganfallpatienten keine kohlenhydratreichen Lösungen gegeben werden. Eine Hypoglykämie sollte durch Infusion einer 10-20% Glukoselösung ausgeglichen werden ^[5].

2.2.1.5 Körpertemperatur

Es ist bekannt, dass erhöhte Körpertemperaturen das Infarktareal vergrößern können und bei Schlaganfallpatienten mit einer schlechteren Prognose verbunden sind. Obwohl bislang keine kontrollierten klinischen Studien vorliegen, sollten Körpertemperaturen über 37,5°C bei Schlaganfallpatienten mit antipyretischen Substanzen wie Paracetamol behandelt werden ^[63].

2.2.1.6 Kontrolle des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes

Massive Elektrolytentgleisungen nach ischämischen Infarkten sind eher selten. Dennoch sollte für einen ausgeglichenen Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalt gesorgt werden, der für eine normale Rheologie des Blutes erforderlich ist. Eine tägliche Kontrolle der Elektrolyte sollte erfolgen und bei Bedarf entsprechend substituiert werden ^[5].

2.2.2 *Rekanalisierende Therapie*

Die intravenöse thrombolytische Therapie mit recombinant tissue plasminogen activator (rtPA, 0,9 mg/kg/KG innerhalb eines drei Stunden-Fensters) führt zu einem signifikant verbesserten Outcome nach einem ischämischen Schlaganfall ^[33; 79]. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass diese Therapieform bis zu sechs Stunden nach Symptombeginn für eine Untergruppe von Schlaganfallpatienten von Nutzen sein kann. Die Lysetherapie mit rtPA ist in Nordamerika und in Europa für die Behandlung des ischämischen Schlaganfalles innerhalb eines drei Stunden Fensters zugelassen. Bei Patienten mit schweren Infarkten (NIH Stroke Scale > 22, in Anhang 1) und ausgedehnten Infarktfrühzeichen ist die Lysebehandlung infolge des Risikos von Sekundärblutungen und der Gefahr einer Hirnödembildung kontraindiziert. Nach den Zulassungskriterien in Deutschland sollte die Lysetherapie des Schlaganfalles nur in Zentren durchgeführt werden, die Erfahrung mit der Frühdiagnose von Schlaganfällen und der neuroradiologischen Beurteilung von Infarktfrühzeichen haben ^[33; 79]. Weitere Zulassungsbeschränkungen in Deutschland betreffen das Patientenalter und die medikamentöse Vorbehandlung mit Thrombozytenaggregationshemmern ^[33; 79].

Die intra-arterielle thrombolytische Behandlung mit pro-Urokinase führte bei Patienten mit Verschlüssen der proximalen A. cerebri media innerhalb von sechs Stunden nach Symptombeginn in einer randomisierten Studie zu einer deutlichen Verbesserung des Outcome ^[33]. Bei fluktuierendem Beginn kann das Zeitfenster bis zu zwölf Stunden betragen, nach einer Komadauer von mehr als vier Stunden ist in der Regel kein günstiges Outcome zu erwarten ^[5].

2.2.3 Frühe Sekundärprophylaxe

Eine Aspirin-Behandlung innerhalb von 48 Stunden nach einem Schlaganfall führt zu einer leichten Reduktion der Mortalität und Wiederauftretensrate von Schlaganfällen ^[76]. Weitere Thrombozytenaggregationshemmer sind bei dieser Indikation bisher nicht untersucht worden.

Weder für die intravenöse Applikation von unfractioniertem Heparin noch für die Gabe von niedermolekularem Heparin konnte bisher ein eindeutig positiver Effekt auf das Outcome der Patienten gezeigt werden ^[76]. Obwohl es Hinweise auf ein besseres Behandlungsergebnis in Bezug auf Verminderung von Schlaganfallrezidiven gab, wurden die positiven Effekte durch eine erhöhte Rate an hämorrhagischen Komplikationen ausgeglichen. Die PTT-relevante intravenöse Heparin-Behandlung könnte daher nur bei Schlaganfallpatienten eine Möglichkeit darstellen, die ein erhöhtes Risiko für embolische Infarkte besitzen und bei denen keine Blutungskomplikationen zu erwarten sind ^[5].

2.2.4 Vorbeugung und Behandlung von Komplikationen

Im weiteren Verlauf ist eine ausreichende Vorbeugung bzw. eine Behandlung von Komplikationen unumgänglich. Zu den häufigsten auftretenden Komplikationen zählen die Aspirationspneumonie (bakterielle Pneumonien verursachen 15-20% der Todesfälle nach einem Schlaganfall), Harnwegsinfekte, Lungenembolien (an Lungenembolien versterben bis zu 5% aller Schlaganfallpatienten unabhängig von der Prognose des Schlaganfalls), tiefe Beinvenenthrombosen, Dekubitalgeschwüre und epileptische Krampfanfälle ^[5].

2.3 Kallikrein-Kinin-System

Während des komplexen Vorgangs der ischämischen Hirnschädigung kann man grundsätzlich zwei Arten unterscheiden: die primäre und die sekundäre Schädigung.

Der primäre Schaden ist durch eine irreversible Schädigung der Hirnsubstanz charakterisiert, welcher nicht mehr durch eine medikamentöse oder andersartige Therapie zu beeinflussen ist. Dieser Bereich ist der Kern des ischämischen Geschehens, der nicht durch Kollateralgefäße versorgt wird. Umgeben ist der Kernbereich von der sogenannten Penumbra. Zellschädigungen in diesem Bereich entstehen erst sekundär. Die synaptische Übertragung ist zwar eingestellt, aber das Ionengleichgewicht ist vorerst noch erhalten. Ein Ausfall der neuronalen Funktionsfähigkeit der Zellen, die in der Penumbra liegen, ist voll reversibel, wenn eine ausreichende Reperfusion wiederhergestellt werden kann ^[56]. Dies kann auch noch mehrere Stunden nach Ischämiebeginn möglich sein. Hauptursachen für eine Ausweitung des Infarktes liegen wahrscheinlich in einer Azidose, einem post-ischämischen Hirnödem, und in einer Unterdrückung der Proteinsynthese begründet. Zentraler Diskussionspunkt in der Pathophysiologie der ischämischen Schädigung ist ein Mangel an Energie. Ein verminderter zellulärer ATP-Spiegel führt zu einem Abbau von Molekülen mit enormer Wichtigkeit für Membran- und Zellintegrität. Zusätzlich kommt es zu einem Verlust der Ionenhomöostase (Ca^{++} , Na^{+} und Cl^{-} Anreicherung eingeschlossen) mit dem darauf folgenden osmotisch bedingten Wassereinstrom und damit zur Ausbildung eines Hirnödems. Das Hirnödem ist eine der Hauptursachen für die lebensbedrohliche Situation der Schlaganfallpatienten, die mit einer hohen frühen Sterblichkeit einhergeht ^[21; 41]. Des Weiteren kommt es zur Produktion von Säuren, welche zu einer intra- und extrazellulären pH-Erniedrigung führen. Aller Wahrscheinlichkeit nach spielt auch ein Anstieg des intrazellulären Calciums eine wichtige Rolle in der Pathogenese des ischämischen Zellschadens ^[68; 69].

Fokus der heutigen Forschung ist der Schutz der Penumbra. Hierbei handelt es sich um den Gewebereich, der das primär geschädigte Areal umgibt. Durch verschiedene Mediatoren und Mechanismen stirbt die Penumbra ab, d. h. das Infarktvolumen vergrößert sich. Eine größere Rolle hierbei spielen Apoptose, Glutamat und inflammatorische Prozesse. Bereits wenige Minuten nach Einsetzen der Ischämie

kommt es zu einer Exzitotoxizität sowie zu Peri-Infarktdepolarisationen. Im weiteren Verlauf, d. h. Minuten bis Stunden, kommt es zum Einsetzen der inflammatorischen Reaktion. Führender und sehr frühzeitig auftretender Mediator der inflammatorischen Komponente ist Bradykinin. Aufgrund der ischämischen Gewebsschädigung kommt es zu einer kontinuierlichen Ausschüttung von Bradykinin ^[22].

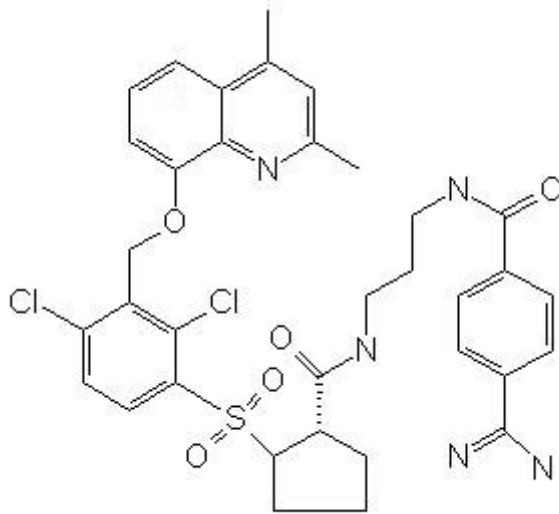
Die Existenz des Kallikrein-Kinin-Systems wurde 1928 von dem Chirurgen Emil Karl Frey und dem Physiologen Heinrich Kraut zum ersten Mal beschrieben ^[24]. Bradykinin zählt mit Kallidin zusammen zu den zwei Hauptvertretern der Kinine. Beide sind aktive Peptide, entstanden aus einer enzymatischen Spaltung der Kininogene. Heute ist hinlänglich bekannt, dass Bradykinin hauptsächlich im Plasma zu finden ist, während Kallidin vornehmlich im Gewebe nachzuweisen ist. Hochmolekulares Kininogen (120 kDa) wird enzymatisch durch die Plasmaprotease Kallikrein (90 kDa) gespalten. Dies führt zur Bildung von Bradykinin. Aus niedermolekularem Kininogen (68 kDa) wird durch eine nur im Gewebe vorhandene, niedermolekulare Gewebsprotease Kallikrein (30 kDa) Kallidin enzymatisch freigesetzt ^[57]. Ihre Wirkung wird über G-Protein vermittelte Rezeptoren, B₁ und B₂, übertragen und zeigt alle Facetten der inflammatorischen Reaktion - Schmerz, Hyperämie und Gewebeswellung eingeschlossen ^[7]. Hierbei aktivieren sie die Produktion und Freisetzung von Eicosaniden, Zytokinen, NO und exzitatorischen Aminosäuren zusammen mit einer intrazellulären Ca⁺⁺-Ionen Freisetzung ^[22; 54]. Des Weiteren öffnen Kinine die Blut-Hirn-Schranke und erweitern extra- und intraparenchymale cerebrale Arterien ^[70; 77]. Diese Eigenschaften führen, wie inzwischen bekannt ist, zu Schäden an neuronalem Gewebe als auch zu lang andauernden Blut-Hirn-Schranken Störungen ^[22; 54; 78]. Hauptsächlich verantwortlich für die akuten physiologischen Auswirkungen von Bradykinin ist der B₂-Rezeptor ^[62]. In peripheren Organen induziert Kinin eine Vasodilatation, erhöht die Gefäßpermeabilität und stimuliert primär afferente Neurone zur Schmerzauslösung ^[7; 34]. Inzwischen sind alle Komponenten des Kallikrein-Kinin-System identifiziert ^[13; 60; 61] und lassen sich im Gehirn nachweisen ^[67; 78]. Ein Vergleich der beiden Bradykinin-Rezeptoren zeigt nur eine 36%-tige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz. Betrachtet man die Wirkungen der beiden Rezeptoren getrennt, so zeigt sich bei einer Blockade des B₂-Rezeptors eine Reduzierung des Infarktvolumens, nach zerebraler Ischämie ^[16; 30; 64; 82] bzw. eine Verminderung des Hirnödems nach

zerebralem Hirntrauma ^[30; 55]. Weiter auffällig ist die ständige Präsenz des B₂-Rezeptors durch konstante Expression in vielen Gewebstypen, wohingegen der B₁-Rezeptor hauptsächlich an pathologischem Geschehen beteiligt ist und erst nach chemischen, mechanischen und inflammatorischen Stimuli stark hochreguliert wird. Dabei verstärkt er die Überreaktion des B₂-Rezeptors im Krankheitsgeschehen ^[47].

2.4 Studienziel

Im Zuge einer zerebralen Ischämie kommt es im Gehirn zu einem Anstieg von Kininen und Kininogen und es findet ein erhöhter Verbrauch von Kininogen im zerebralen Blutkreislauf statt ^[46]. Die entscheidende Rolle, die Bradykinin-B₂-Rezeptoren beim postischämischen Hirnschaden spielen, ist durch Untersuchungen an B₂-Rezeptor-Knock-out Mäusen ^[30] und durch verschiedene pharmakologische Studien belegt ^[16; 64; 82]. Für die Hemmung von B₂-Rezeptoren wurden zwei verschiedene Inhibitoren verwendet: Proteinbasierende Inhibitoren ^[64] und Small-Molecules-Inhibitoren ^[16; 82], wie in dieser Studie. Der Vorteil von Small-Molecules-Inhibitoren im Vergleich zu den proteinbasierenden Inhibitoren liegt in ihrer besser reproduzierbaren Produktion sowie der längeren Haltbarkeit und einer daraus folgenden leichteren klinischen Anwendbarkeit. Für diese Studie wurde daher ein spezifischer und bereits ausführlich beschriebener Small-Molecule-Bradykinin-B₂-Rezeptoren-Antagonist, LF 16-0687 Ms verwendet ^[58; 59; 82].

Abbildung 1: LF 16-0687 Ms



Er passiert die Blut-Hirnschranke und hat bei der Ratte eine Halbwertszeit von mehreren Stunden.

Nach experimentellem traumatischem Hirnschaden ^[4; 16; 38; 39; 55; 72; 73] und zerebraler Ischämie in der Ratte und der Maus ^[16; 82] verbessert LF 16-0687 Ms die neurologische Funktion, verringert die Hirnödemausbildung und verhindert dadurch den zerebralen Sekundärschaden.

Da vom Zeitpunkt des Schlaganfalls bis zum Eintreffen des Patienten in der Klinik oft mehrere Stunden vergehen und vor Beginn einer Therapie erst noch zeitaufwendige Diagnostik durchgeführt werden muss, müssen potentielle Medikamente für den Schlaganfall ein großes Zeitfenster von mehreren Stunden haben. In bisherigen Studien wurde nur gezeigt, dass Bradykinin-B₂-Rezeptoren-Antagonisten neuroprotektive Wirksamkeit besitzen, wenn sie innerhalb der ersten 30 Minuten nach Einsetzen der Ischämie gegeben werden ^[16; 30; 64; 82]. Durch diese Studien gewann man erste Hinweise über die entscheidende Rolle von Bradykinin-B₂-Rezeptoren in der zerebralen Ischämie. Unklar war bisher jedoch, ob die Wirksamkeit auch dann noch vorhanden ist, wenn die Applikation um mehrere Stunden hinausgezögert wird.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der Zeitraum, in dem Bradykinin zur Ausbildung eines Hirnödems führt. Da Bradykinin einer der ersten inflammatorischen Mediatoren ^[22] ist (HWZ 30 Sek.), ist unklar, ob Stunden oder Tage nach einem akuten Geschehen überhaupt noch ein Einfluss von Bradykinin vorliegt? Zwei Punkte sind in diesem Zusammenhang zu nennen: Zum einen kann das Kininsystem selbst eine weitere Produktion von Bradykinin stimulieren, um den schnellen Verbrauch zu ersetzen. Kallikrein selbst ist ein äußerst potenter Aktivator der Reaktion, in der Faktor XII zu Faktor XIIa umgewandelt und dadurch aktiviert wird. Faktor XIIa wiederum wandelt Prekallikrein in das aktive proteolytische Enzym Kallikrein um. Dadurch ist eine positive Rückkopplung geschaffen ^[22]. Zum anderen haben Studien über die Messung der Bradykininproduktion nach zerebraler Läsion eine verlängerte Aktivität des Bradykininsystems gezeigt ^[19].

Ziel dieser Studie war das optimale Zeitfenster für die Applikation des Bradykinin-B₂-Rezeptor-Antagonisten LF 16-0687 Ms ^[58] nach 90-minütiger Okklusion der A. cerebri media bei der Ratte zu finden. Als Dosis für LF 16-0687 Ms wurde, basierend auf Daten aus unserer Arbeitsgruppe ^[45], 1 mg/kg Körpergewicht gewählt.

3 MATERIAL UND METHODIK

3.1 Material

Alle verwendeten Materialien sind nach Gruppen sortiert und alphabetisch im Anhang 2 aufgelistet.

3.2 Methodik

3.2.1 Versuchstiere

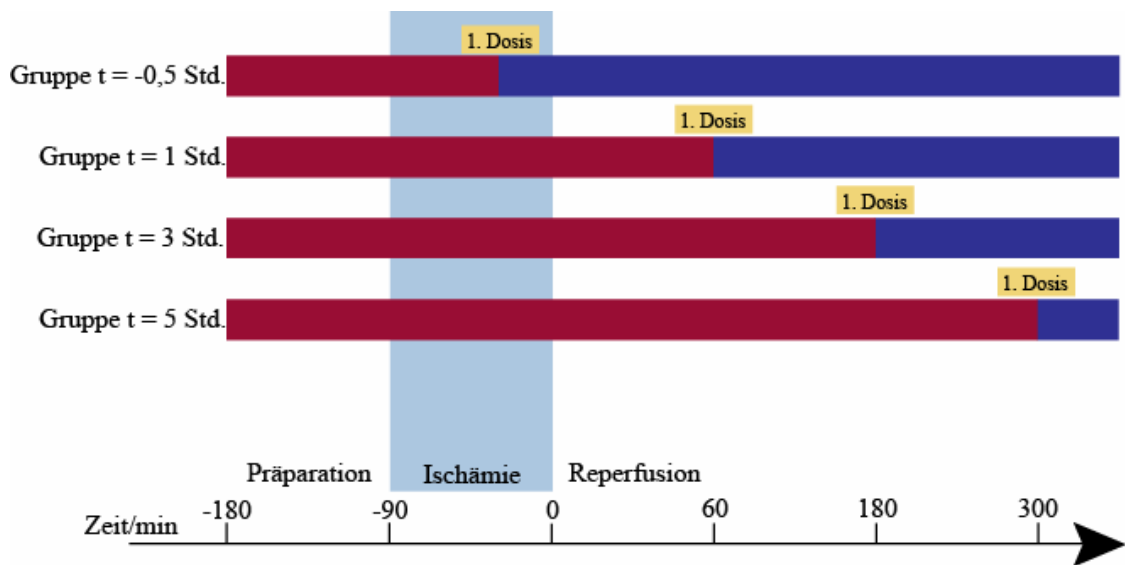
Bei allen Versuchen wurden männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 250 – 300 g verwendet (Charles River Laboratory, Deutschland). Jeweils zwei Tiere sind in einem Makrolonkäfig Nr. 3 gehalten worden. Die Tiere hatten ständig freien Zugang zu Wasser und Standardfutter. Während des gesamten Versuchszeitraumes wurden die Tiere vom Personal der Tierhaltung des ICF (Leiterin Frau Blount) tierpflegerisch versorgt. Die veterinärmedizinische Betreuung wurde von Herrn Dr. med. vet. E. Thein übernommen.

3.2.2 Versuchsaufbau

Für die Studie wurden die Tiere randomisiert vier Gruppen zugewiesen. Die insgesamt zehn Kontrollgruppentiere wurden auf die vier Versuchsgruppen randomisiert verteilt. Als Zeitpunkt Null ($t = 0$ Std.) wurde das Ende der Ischämie gewählt.

Basierend auf Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe ^[45] wurde eine Gesamtdosis von 1 mg/kg Körpergewicht/Tag verwendet. Die Randomisierung der Tiere in die jeweilige Studiengruppe erfolgte 30 Minuten vor Ischämieende. So konnte die Operation verblindet durchgeführt und für alle Tiere die gleichen Operationsbedingungen geschaffen werden. Der Kontrollgruppe wurde das Lösungsmittel von LF 16-0687 Ms, 0,9 % NaCl – Lösung appliziert.

Abbildung 2: Versuchsaufbau



Die Abbildung zeigt schematisch die Zeitpunkte der ersten Applikation von LF 16-0687 Ms im Verhältnis zur Ischämie und Reperfusion. Die zehn Kontrolltiere wurden auf alle Gruppen verteilt.

Tabelle 1: Gruppeneinteilung

| 1. Applikation | 0,5 Std. vor Ischämieende | 1 Std. nach Ischämieende | 3 Std. nach Ischämieende | 5 Std. nach Ischämieende |
|------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Anzahl der Tiere | 10 | 10 | 9 | 10 |
| Kontrolle | Zehn Kontrolltiere wurden randomisiert auf alle Gruppen verteilt | | | |

3.2.2.1 LF 16-0687 Ms: Lagerung und Zubereitung

Das Mesylatsalz von LF 16-0687 (1-[[2,4-dichloro-3-[(2,4-dimethylquinolin-8-yl)oxy]methyl]phenyl]sulfonyl]-N-[3-[[4-(aminoiminomethyl)phenyl] carbonylamino] propyl]-2(S)-pyrrolidinecarboxamide, MW 989) wurde in Pulverform bei 4°C gelagert und für jede Anwendung frisch in physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

3.2.2.2 Applikation

Zur Applikation des Medikamentes wurden 1,5 mg LF 16-0687 Ms auf einer Mikrowaage abgewogen und in 15 ml NaCl gelöst. Diese Menge wurde gewählt, da aus technischen Gründen der Mikrowaage mindestens 1,2 mg abgewogen werden müssen, um Messfehler zu vermeiden. Von dieser Lösung wurden je 1,5 ml in 2 ml Spritzen aufgezogen.

Die Dosis wurde den Ratten unter die Rückenhaut gespritzt. Das Medikament wurde an drei aufeinander folgenden Tagen verabreicht, wobei die Tagesgesamtdosis aus zwei Applikationen mit jeweils der halben Menge bestand. Die ersten beiden Dosen wurden den Versuchstieren am Operationstag verabreicht. Die erste Applikation erfolgte nach Gruppeneinteilung wie in Tab. 1 zu sehen. Weitere Applikationen entsprachen dem folgenden Schema:

Tabelle 2: Applikationsschema

| 1. Dosis | 2. Dosis | 3. Dosis | 4. Dosis | 5. Dosis | 6. Dosis |
|-----------------------------------------|----------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| Abhängig von Gruppeneinteilung (Tab. 1) | 6 Std. nach 1. Dosis | 1. POT 9.00 Uhr | 1. POT 17.00 Uhr | 2. POT 9.00 Uhr | 2. POT 17.00 Uhr |

(POT: postoperativer Tag)

Insgesamt wurden 50 Tiere verwendet. Tiere, bei denen eine Subarachnoidalblutung festgestellt wurde (siehe 3.2.3.2), wurden aus der Wertung genommen und ersetzt, so dass in jeder Gruppe die volle Versuchstierzahl (mit Ausnahme Gruppe t = 3 Std. (9 Tiere)) erreicht wurde. Das Versuchsprotokoll ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

3.2.3 Versuchsdurchführung

3.2.3.1 Anästhesie und Operationsvorbereitung

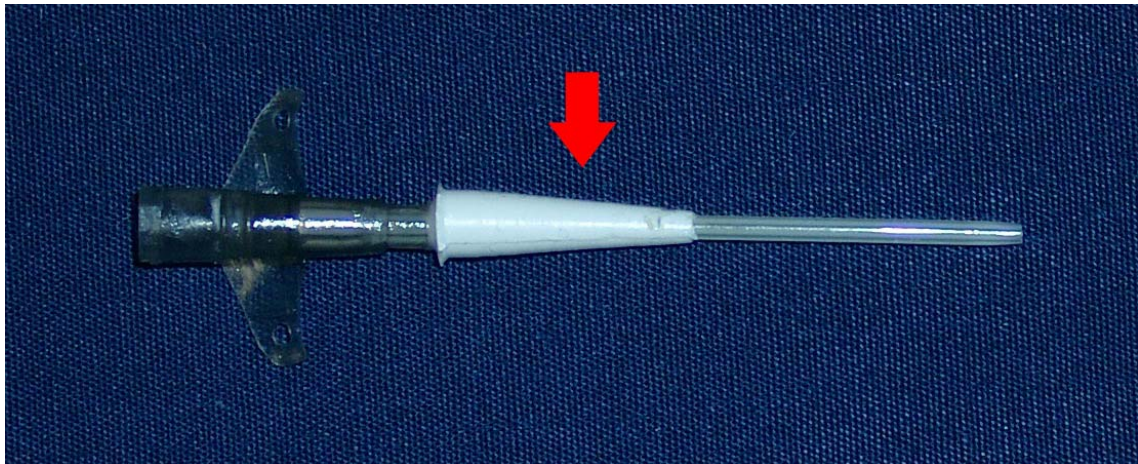
Den Versuchstieren wurde am Abend vor der Operation bei freiem Zugang zu Wasser

das Futter entzogen.

Die Narkoseeinleitung erfolgte in einem Behälter mit 4 Vol % Halothan. Die Tiere wurden mit 0,5 mg/kg Atropin subcutan prämediziert und dann orotracheal mit einem speziell dafür gefertigten Kanülentubus intubiert (Abb.3). Die Narkose wurde mit 0,8 % Halothan in einer Mischung aus 67 % Lachgas (N₂O) und 33 % Sauerstoff (O₂) unter druckkontrollierter Beatmung aufrechterhalten. Durch diese Verfahrensweise konnte eine standardisierte Narkoseführung gewährleistet werden ^[80]. Um eine Austrocknung der Augen während der Narkose zu vermeiden, wurde die Augen mit Bepanthen Augen- und Nasensalbe bedeckt. Die Körpertemperatur wurde rektal gemessen und konstant mit einer Wärmplatte auf 37°C gehalten. Die Hirntemperatur korreliert mit der unter dem Musculus temporalis ^[12; 48] gemessenen Temperatur. Daher wurde ein in eine Kanüle eingebettetes Miniaturmantelthermoelement unter dem M. temporalis platziert. Über unabhängige Regelkreise wurden die rektale und die subtemporale Temperatur konstant bei 37°C gehalten. Zur Blutdruckkontrolle, Bestimmung von Laborparametern und arteriellen Blutgasen zur Narkosesteuerung wurde ein Katheter in die Schwanzarterie gelegt (Polyethylen, Portex, England). Während des Versuchs wurden der mittlere arterielle Blutdruck (MAP), Blutgase und Blutzuckerspiegel zu folgenden Zeitpunkten kontrolliert und aufgezeichnet:

1. Kontrolle: Direkt nach Katheteranlage
2. Kontrolle: Direkt vor Fadenvorschub
3. Kontrolle: 45 min nach Ischämiebeginn
4. Kontrolle: 15 min nach Ischämieende

Abbildung 3: Orotrachealer Tubus



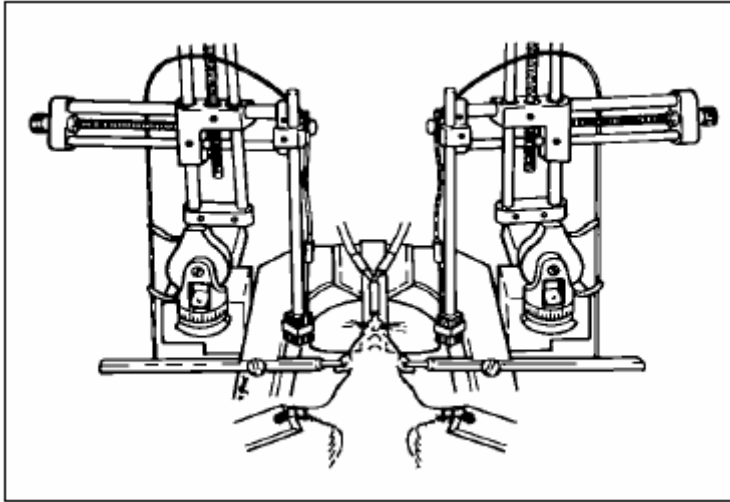
Der Tubus wurde aus einer handelsüblichen Venen-Verweilkanüle G 16 angefertigt. Zur Abdichtung im Bereich der Ligamenta vocalis wurde um die Kanüle herum ein Silikonkonus (Pfeil) angebracht. Das Ende der Kanüle wurde zu Adaptionzwecken abgeschliffen.

3.2.3.2 Laser-Doppler Flowmetrie

Über dem somatosensorischen Kortex wurde beidseits 5 mm lateral und 1mm dorsal des Bregmas ein Bohrloch angelegt (Durchmesser: 1 mm), ohne die Dura mater zu verletzen. Dieses Areal repräsentiert das Versorgungsgebiet der A. cerebri media ^[51]. Die Versuchstiere wurden dann in ihrer endgültigen Position im stereotaktischen Rahmen unter Schonung der Trommelfelle fixiert. Die Spitzen zweier abgewinkelter Laser-Doppler Sonden wurden mittels Mikromanipulatoren in die Bohrlöcher platziert. (Abb. 5). Dieser Versuchsaufbau ermöglicht eine kontinuierliche Messung (2 Hz) des lokalen zerebralen Blutflusses (LCBF, local cerebral blood flow) bzw. der mikrovaskulären Perfusion in beiden Hemisphären (MBF3D, Moor Instruments Ltd., England). Durch den Abfall des LCBF wird die Induktion der Ischämie objektiviert. Relative Veränderungen der lokalen Durchblutung, beispielsweise im Sinne einer postischämischen Hyper- oder Hypoperfusion, oder eine Beeinflussung durch Pharmaka werden erkennbar ^[17; 31]. Kommt es während des Gefäßverschlusses versehentlich zu einer Perforation intrakranieller Gefäße, kann eine dadurch induzierte Subarachnoidalblutung (SAB) anhand des LCBF-Monitorings sofort erkannt und somit die Versuchstiere aus der Studie ausgeschlossen werden. Eine insuffiziente

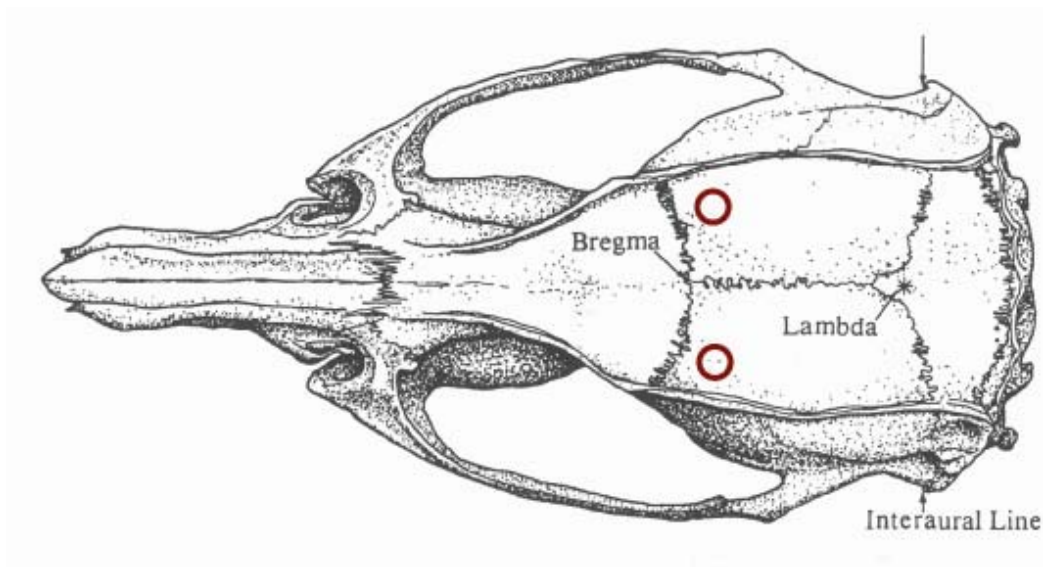
Gefäßokklusion, die als häufigste Komplikation dieses Modells beschrieben ist, kann binnen Sekunden erfasst und korrigiert werden ^[66].

Abbildung 4: Versuchsaufbau



Die Versuchstiere werden in Rückenlage im stereotaktischen Rahmen fixiert. Die Spitzen zweier abgewinkelter Laser-Doppler Sonden werden mit Hilfe von Mikromanipulatoren in den vorher angelegten Bohrlöchern platziert. Dieser Versuchsaufbau ermöglicht eine kontinuierliche Messung der lokalen mikrovaskulären Perfusion in beiden Hemisphären ohne Repositionierung der Sonden.

Abbildung 5: Laser-Doppler Sonden Platzierung



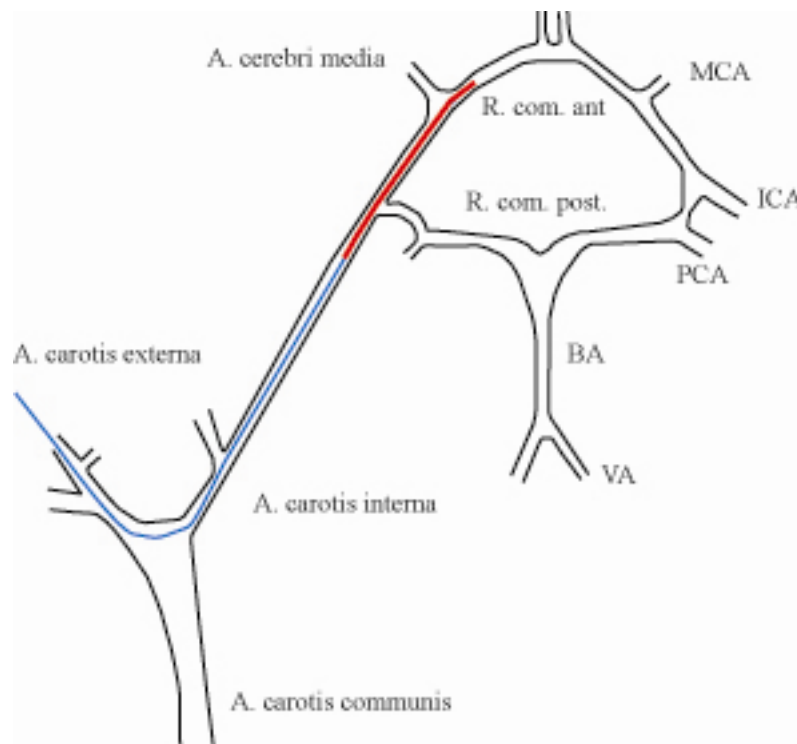
Beidseits über dem somatosensorischen Kortex fünf Millimeter lateral und ein Millimeter okzipital des Bregmas wurden die Bohrlöcher (\varnothing 1 mm) ohne Verletzung der Dura mater gesetzt. Die roten Kreise markieren die Bohrlöcher mit Sondenposition.

3.2.3.3 Intraluminales Fadenmodell der fokalen zerebralen Ischämie

Als Modell für die fokale zerebrale Ischämie wurde das intraluminale Fadenmodell nach Koizumi ^[40] (Okklusion der A. cerebri media bei Ratten mit Induktion einer Rezirkulation) gewählt. Dazu wurde im Halsbereich ein paramedianer Hautschnitt angelegt und das Platysma durchtrennt. Über eine Verlagerung der oberflächlich gelegenen Gdl. submandibularis zusammen mit dem M. sternocleidomastoideus nach lateral und durch gleichzeitiges Abschieben der Zungenbeinmuskulatur nach medial ergab sich der Zugang zur A. carotis. Die A. carotis communis und die Karotisbifurkation wurden mikrochirurgisch vom umgebenden Bindegewebe unter Schonung des N. vagus freipräpariert. Anschließend wurde die A. carotis externa aufgesucht, etwa 5 mm distal der Karotisbifurkation ligiert und durchtrennt.

Ein 4-0 Prolene-Faden (Ethicon GmbH, Deutschland) wurde über den proximalen Stumpf der A. carotis externa in die A. carotis interna vorgeschoben bis es zu einem Abfall der Perfusion im ipsilateralen Mediaversorgungsgebiet kam, der sich durch eine

Abbildung 6: Okklusion der A. cerebri media



Ein 4-0 Prolene-Faden wird über die A. carotis externa in die A. carotis interna eingeführt und vorgeschoben, bis sein distales, silikonbeschichtetes Ende den Abgang der A. cerebri media verschließt (rot dargestellt). Die Kollateralzirkulation über die A. communicans anterior und posterior ist ebenfalls ausgeschaltet. BA = A. Basilaris; ICA = A. carotis interna; MCA = A. cerebri media; PCA = A. cerebri posterior; VA = A. vertebralis.

3.2.3.4 Quantifizierung der ischämischen Schädigung

Zur Quantifizierung der ischämischen Schädigung wurde das funktionelle neurologische Defizit, das Gewicht an den ersten sieben postoperativen Tagen, sowie histomorphologisch die Infarktgröße nach Tötung der Tiere am siebten postoperativen Tag bestimmt.

3.2.3.4.1 Quantifizierung des neurologischen Defizits

Zur Quantifizierung des neurologischen Defizits wurde täglich, immer zur gleichen Zeit, ein nach Bederson et al. ^[6] modifizierter Neuro-Score durchgeführt. Dadurch wurden Fehler durch tageszeitliche Schwankungen ausgeschlossen. Um eine objektive Bewertung sicher zu stellen, wurde der Score von einem Untersucher erhoben, der keine Kenntnis über die Gruppeneinteilung der Tiere hatte. Die Bewertung erfolgte nach folgendem Schema:

Tabelle 3: Neuro-Score

| | |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0 Punkte | Keine Spontanbewegung |
| 1 Punkt | Spontanes Circling in Richtung der Hemiparese |
| 2 Punkte | Circling nur bei erhöhtem Kraftaufwand (Zug am Schwanz) |
| 3 Punkte | Kein Circling, verminderte Standstabilität bei Druck von der Seite |
| 4 Punkte | Kein Circling, keine verminderte Standstabilität. Bei Anheben am Schwanz und Annäherung an den Boden, Unfähigkeit, die zum Infarkt kontralaterale Vorderpfote zu strecken (eingeschränkter Stellreflex) |
| 5 Punkte | Neurologisch unauffällige Versuchstiere |

3.2.3.4.2 Quantifizierung des morphologischen Hirnschadens

Am siebten postoperativen Tag wurden die Tiere mit Äther narkotisiert und mit einer Überdosis KCl getötet. Nach transkardialer Perfusionsfixierung mit 2%-tigem Paraformaldehyd wurden die Gehirne zur histopathologischen Aufarbeitung entnommen. In 400-Mikrometer-Intervallen wurden 20 Paraffinschnitte mit einer Dicke von drei Mikrometer auf Objektträger aufgenommen und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Von den 20 Schnitten, die das gesamte Infarktareal enthielten, wurde ipsi- und kontralaterales Hemisphärenvolumen sowie kortikales und subkortikales Infarktvolumen mittels digitaler Planimetrie (OPTIMAS 5.1) bestimmt. Das Volumen (V) ergab sich aus der Summe der Schnittflächen (F_n) multipliziert mit dem Abstand (400 μ m) zwischen den Schnitten:

$$V = 0,4 \times [F1+F2+...+F20]$$

Das Infarktvolumen wurde separat für Kortex und Basalganglien bestimmt. Um die Auswertung zu verblinden, wurde die Gruppenzugehörigkeit der Histoschnitte erst nach Auswertung aller Daten entschlüsselt.

3.3 Statistik

In den Ergebnissen wird der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) bzw. der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) ($MW \pm SD$ o. $MW \pm SEM$) angegeben. Die nicht-parametrischen Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis Test (ANOVA ON RANKS) auf Signifikanz geprüft. Nachgeordnete Vergleiche gegen die Kontrolle wurden entsprechend mit dem nicht-parametrischen Dunnet Test vorgenommen. Für den Vergleich aller Gruppen gegeneinander wurde der Student-Newman-Keul Test verwendet. Die Korrelation der nach HE-Färbung gemessenen Infarktvolumina wurde mittels Pearson Product Moment Correlation errechnet. Die Auswertung erfolgte mit Softwarepaket SigmaStat 2.0. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Mortalität

Während der chirurgischen Präparation und der Induktion der zerebralen Ischämie kam es bei einem Teil der Tiere zu Subarachnoidalblutungen ($n = 5$) oder Narkosezwischenfällen ($n = 7$), welche zu einem Ausschluss aus der Versuchsreihe führten. Diese Tiere wurden durch neue Versuchstiere ersetzt.

Postoperativ zeigte sich in allen Versuchgruppen eine geringe Mortalität. Zwei Tiere der Kontrollgruppe, zwei Tiere der Gruppe $t = 1$ Std., 1 Tier der Gruppe $t = 3$ Std. und ein Tier der Gruppe $t = 5$ Std. verstarben. Alle Tiere wurden durch neue Versuchstiere ersetzt, so dass alle Gruppen (mit Ausnahme der Gruppe $t = 3$ Std. (9 Tiere)) die geplante Größe von $n = 10$ erreichten.

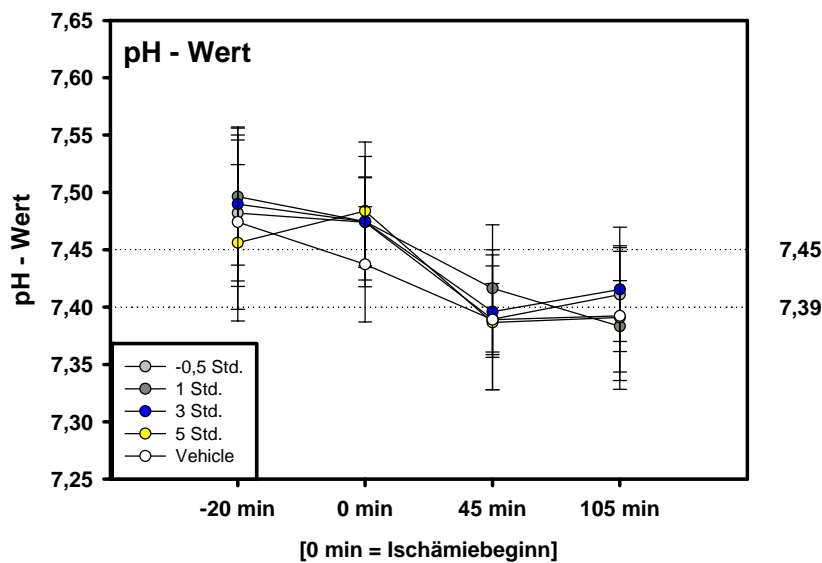
4.2 Physiologische Parameter

Während des gesamten Versuchszeitraumes wurden Blutproben zur Bestimmung des pH-Wertes, des pCO_2 , des pO_2 und der O_2 -Sättigung entnommen. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchs- und den Kontrolltieren. Einzelnen betrachtet lässt sich Folgendes feststellen:

4.2.1 pH-Wert

Über den kompletten Operationszeitraum fällt ein geringer, aber nicht signifikanter Abfall des pH-Wertes auf. Dieser geringe Abfall zeigt sich in allen Gruppen und bleibt im physiologischen Bereich.

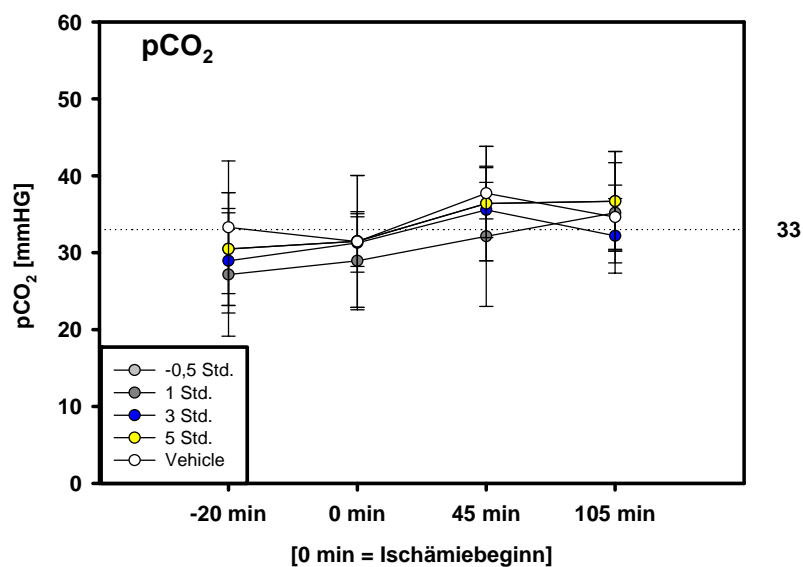
Abbildung 7: pH-Wert



4.2.2 pCO_2

Während der Operation zeigte sich ein leichter, aber nicht signifikanter Anstieg des pCO_2 , der aber im Normbereich blieb und keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen aufwies. Dieser ist am ehesten auf eine leichte Hyperventilation, die zu einer CO_2 Reduktion führt, zurück zu führen.

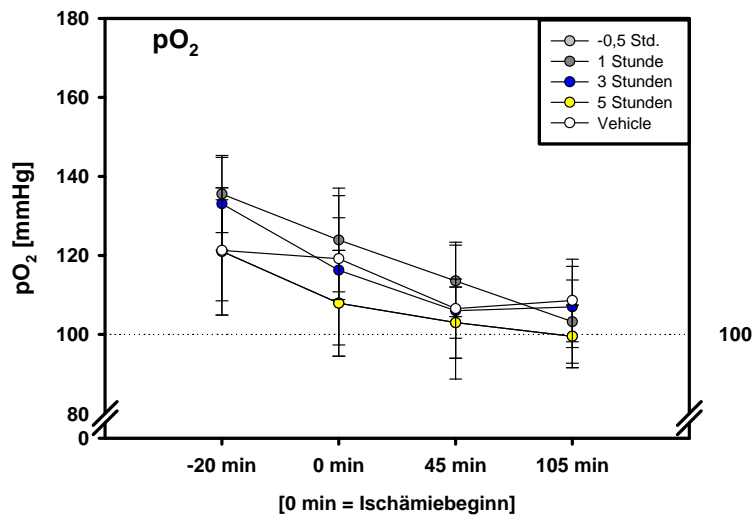
Abbildung 8: pCO_2



4.2.3 pO_2

Auch der pO_2 wurde überwacht. Hier lagen auch über den gesamten Operationszeitraum hinweg die Werte im physiologischen Normbereich.

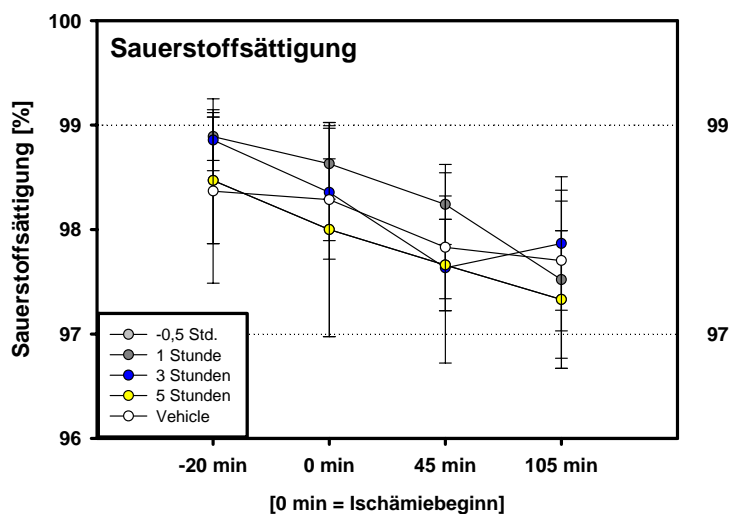
Abbildung 9: pO_2



4.2.4 Sauerstoffsättigung

Für die ausreichende Versorgung des peripheren Gewebes ist die Sauerstoffsättigung entscheidend. Sie lag während der gesamten Versuchszeit im Normbereich über 97%.

Abbildung 10: Sauerstoffsättigung

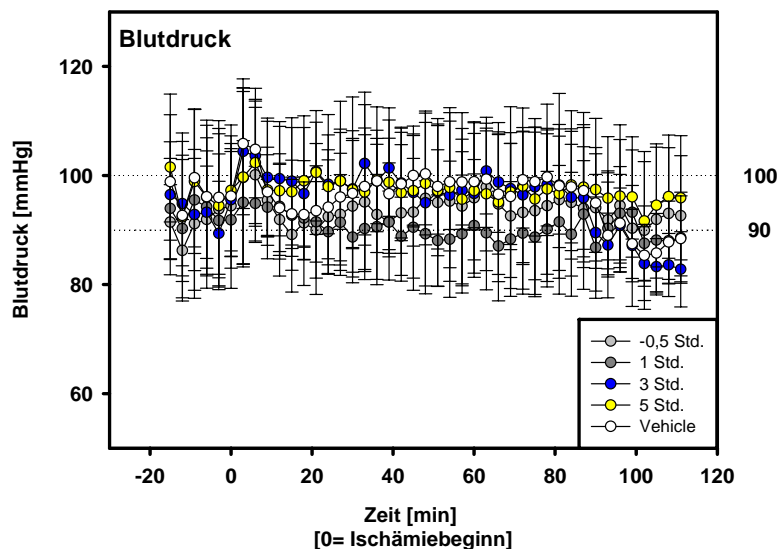


4.2.5 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Der mittlere arterielle Blutdruck, gemessen über einen in der Schwanzarterie liegenden Katheter zeigte einen kurzen Anstieg direkt nach Fadenvorschub und einen geringen Abfall mit Beginn der Reperfusion im Sinne einer physiologischen Stressreaktion. Diese Abweichungen zeigten jedoch keine statistische Signifikanz und blieben im physiologischen Normbereich.

Vergleicht man die Gruppe $t = -0,5$ Std. mit den anderen Gruppen, so war zu erkennen, dass eine Gabe von LF 16-0687 Ms keinen Einfluss auf den MAP hat.

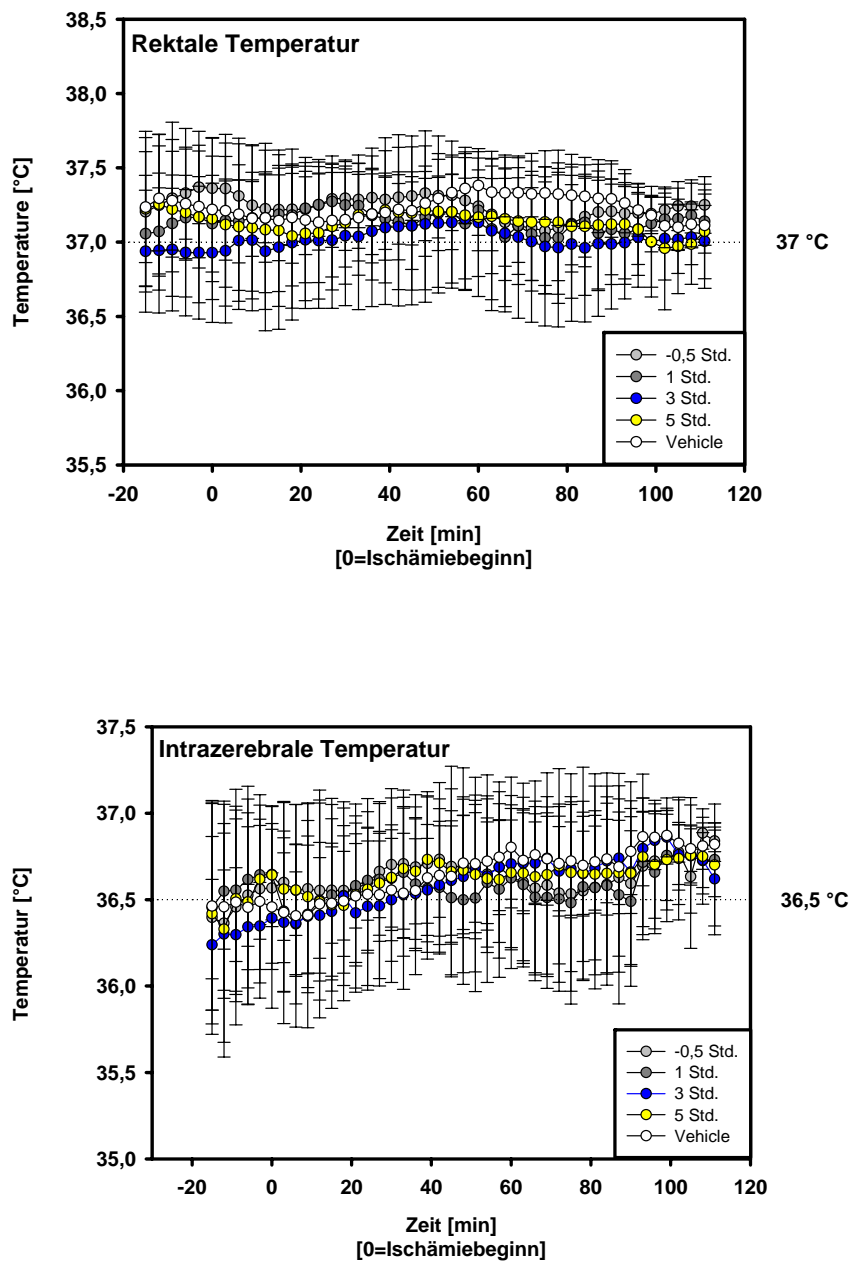
Abbildung 11: MAP



4.2.6 Rektale und temporale Körpertemperatur

Die rektal gemessene Körpertemperatur lag während des gesamten Versuchszeitraumes zwischen 36,8°C und 37,3°C. Die temporale Temperatur, die mit einer konstanten Abweichung von -1°C der intrazerebralen Temperatur entspricht ^[11; 49], lag zwischen 36,2 und 36,7 °C. Damit befanden sich sowohl Körper- als auch die Hirntemperatur im physiologischen Bereich. Eine zerebrale Hypothermie, die als stark neuroprotektiv gilt, wurde nicht festgestellt. Eine postischämische Hyperthermie, welche im intraluminalen Fadenmodell auftreten kann ^[83], wurde ebenfalls nicht beobachtet.

Abbildung 12: Rektale und temporale Körpertemperatur

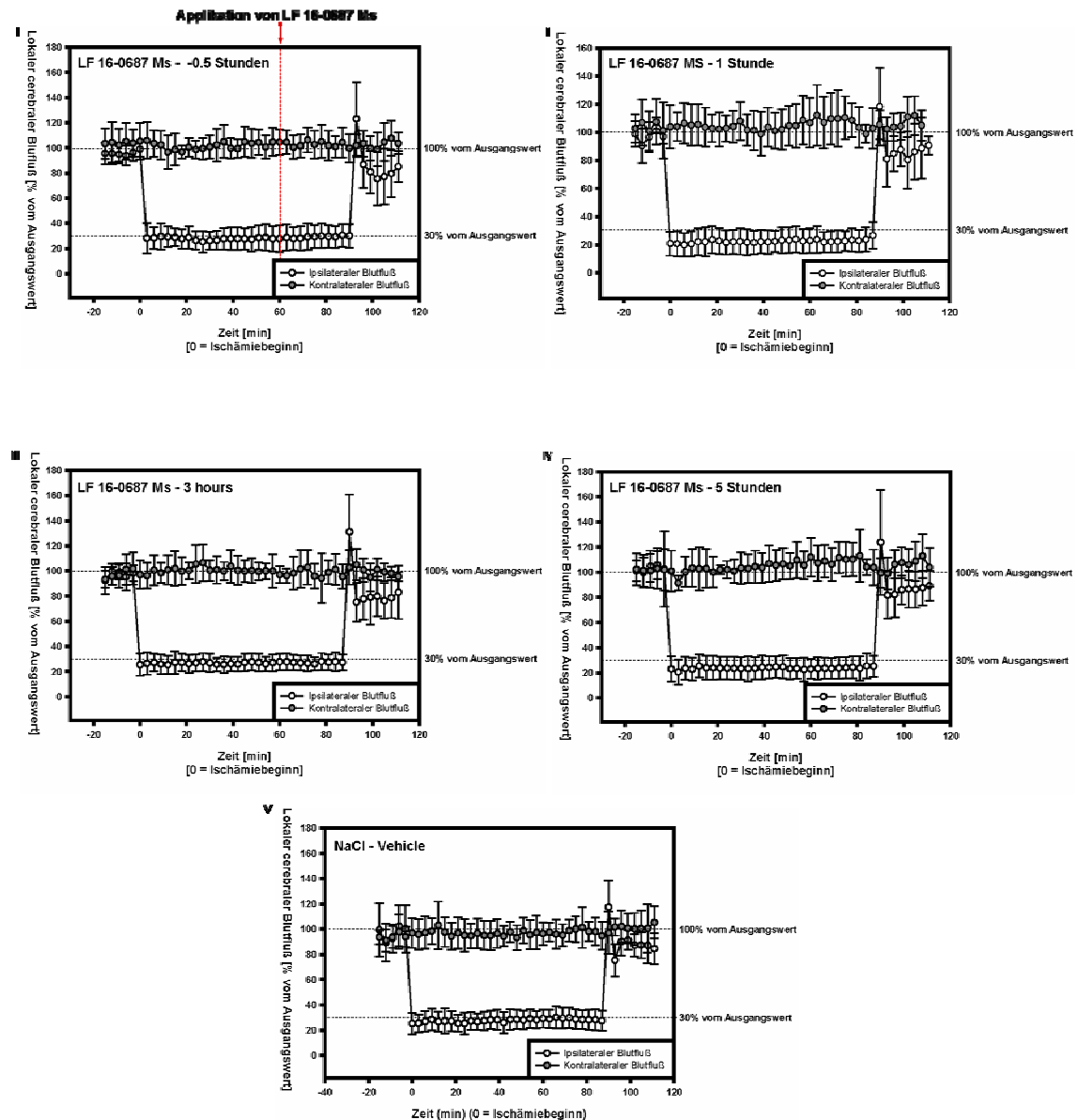


Zusammenfassend zeigt sich, dass während der gesamten Operationszeit pH-Wert, $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$, Sauerstoffsättigung, Hirn- und Körpertemperatur und MAP im physiologischen Normbereich lagen und keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festgestellt wurden.

4.3 Laser-Doppler-Flowmetrie

In den Versuchsgruppen und in der Kontrollgruppe führte die Okklusion der Arteria cerebri media zu einem Abfall des ipsilateralen LCBF auf ischämische Werte von unter 30% des Ausgangswertes. Der kontralaterale LCBF blieb konstant.

Abbildung 13: Laser-Doppler-Flow

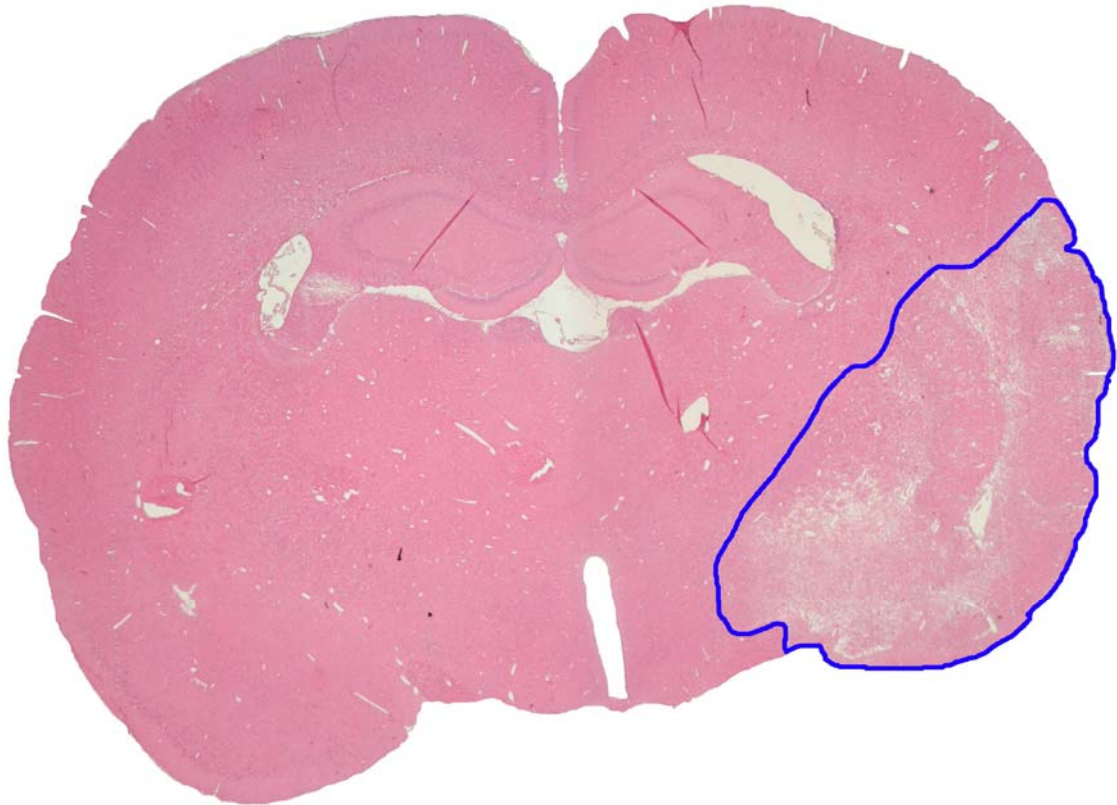


Die Abbildungen I – V zeigen die lokale zerebrale Durchblutung in allen Versuchsgruppen. Auf der x-Achse ist die Zeit angetragen, auf der y-Achse die zerebrale Durchblutung in Prozent vom Ausgangswert vor Induktion der Ischämie ($n = 9-10$). Nach Gabe von LF 16-0687 Ms intraoperativ (Abb. I) kommt es zu keiner Änderung der zerebralen Durchblutung.

Die Reperfusion war begleitet von einer kurzen Hyperämie, gefolgt von einem langsamen Abfall des ipsilateralen LCBF auf ca. 70% des Ausgangswertes, welcher bis ca. 15 Minuten nach Reperfusion bestehen blieb. Insgesamt fiel eine starke Streuung der LDF-Werte während der Reperfusion auf. Ca. 15 Minuten nach Reperfusion stieg der LDF in allen Gruppen wieder leicht an und erreichte teilweise den Ausgangswert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Die Gabe von LF 16-0687 Ms führte zu keiner Änderung der zerebralen Durchblutung.

4.4 Infarktvolumina

Abbildung 14: Histologischer Schnitt zur Auswertung der Infarktvolumina



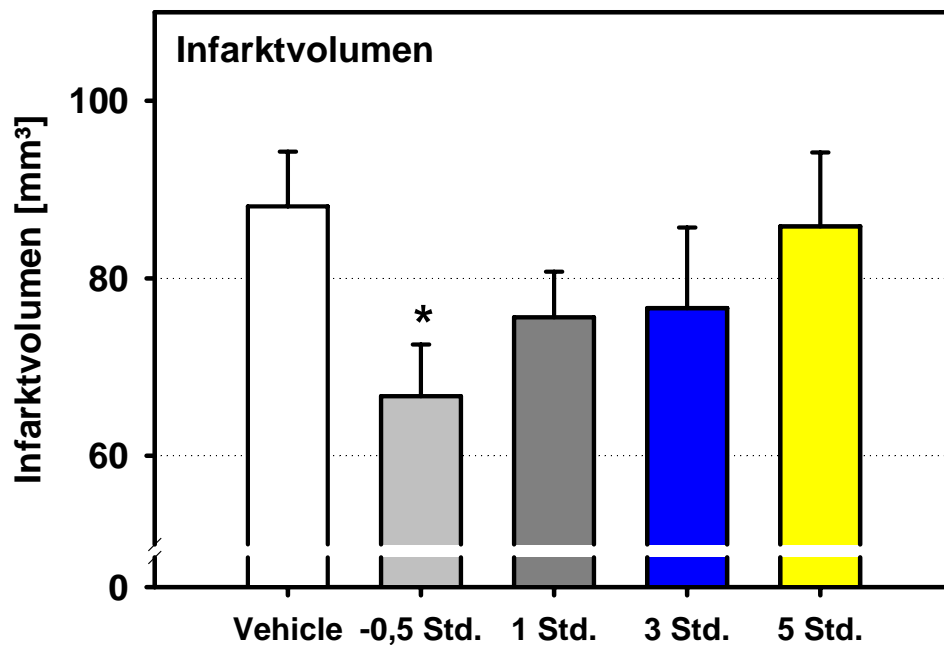
Typisches histologisches Schnittbild mit sichtbarem Infarkt rechts (blau umrandet).

4.4.1 Gesamtvolumen

Die Wirksamkeit des Bradykinin-B₂-Rezeptorantagonisten spiegelt sich in der Verminderung des Gesamtinfraktvolumens wieder.

Das Gesamtinfraktvolumen betrug $88,09 \text{ mm}^3 \pm 19,56 \text{ mm}^3$ bei den Kontrolltieren, $66,72 \text{ mm}^3 \pm 18,36$ bei den Tieren der Gruppe $t = -0,5 \text{ Std.}$, $75,61 \text{ mm}^3 \pm 16,25 \text{ mm}^3$ bei den Tieren der Gruppe $t = 1 \text{ Std.}$, $76,63 \text{ mm}^3 \pm 27,29 \text{ mm}^3$ bei der Gruppe $t = 3 \text{ Std.}$ und $85,85 \text{ mm}^3 \pm 26,37 \text{ mm}^3$ bei der Gruppe $t = 5 \text{ Std.}$ (siehe Abb. 15). Die Therapie mit LF 16.0687 Ms reduzierte das Gesamtinfraktvolumen signifikant um 25% bei den Tieren der Gruppe $t = -0,5 \text{ Std.}$ (Mann-Whitney Rank Sum Test, $p < 0,05$).

Abbildung 15: Gesamtfarkt volumen aller Gruppen



Das Gesamtfarkt volumen (mm^3) ist dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung.

* $p < 0,05$ gegenüber der Kontrollgruppe ($n = 9-10$ pro Gruppe).

4.4.2 Basalganglien

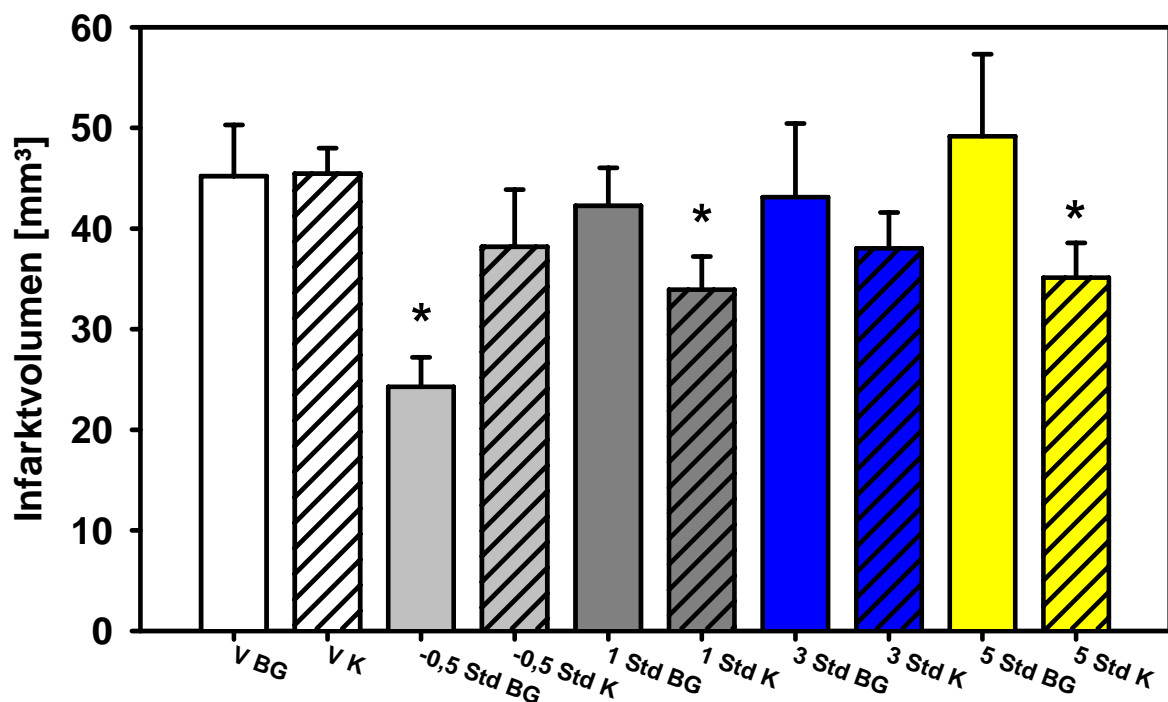
Das Infarkt volumen der Basalganglien betrug $45,46 \text{ mm}^3 \pm 8,01 \text{ mm}^3$ bei der Kontrollgruppe, $24,26 \text{ mm}^3 \pm 9,27 \text{ mm}^3$ bei der Gruppe $t = -0,5 \text{ Std.}$, $33,93 \text{ mm}^3 \pm 10,38 \text{ mm}^3$ bei der Gruppe $t = 1 \text{ Std.}$, $38,02 \text{ mm}^3 \pm 10,70 \text{ mm}^3$ bei den Tieren der Gruppe $t = 3 \text{ Std.}$ und $35,11 \text{ mm}^3 \pm 10,91 \text{ mm}^3$ in der Gruppe $t = 5 \text{ Std.}$ (siehe Abb. 16). Die Behandlung zum $t = -0,5 \text{ Std.}$ reduzierte das Volumen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (ANOVA on Ranks, Dunnet Test, $p < 0,05$)

4.4.3 Kortex

Verglichen mit dem Gesamt-Infarkt volumen und dem Infarkt volumen in den Basalganglien zeigte sich im Bereich des Kortex nur eine geringfügige Abnahme des Infarkt volumens bei den mit dem B_2 -Rezeptor-Antagonisten behandelten Versuchstieren im Unterschied zu den Kontrolltieren.

Das Kortextinfarktvolumen betrug $45,21 \text{ mm}^3 \pm 16,08 \text{ mm}^3$ in den Kontrollen, $38,18 \text{ mm}^3 \pm 17,97 \text{ mm}^3$ bei den Tieren der Gruppe $t = -0,5 \text{ Std.}$, $42,25 \text{ mm}^3 \pm 11,98 \text{ mm}^3$ bei der Gruppe $t = 1 \text{ Std.}$, $43,12 \text{ mm}^3 \pm 21,96 \text{ mm}^3$ bei der Gruppe $t = 3 \text{ Std.}$ und $49,16 \text{ mm}^3 \pm 25,81 \text{ mm}^3$ in der Gruppe $t = 5 \text{ Std.}$ Die Gabe von LF 16-0687 Ms zu den Zeitpunkten $t = -0,5 \text{ Std.}$, $t = 1 \text{ Std.}$ und $t = 5 \text{ Std.}$ ergab einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mann-Whitney Rank Sum Test, $p < 0,05$).

Abbildung 16: Infarktvolumen Basalganglien & Kortex



Das Infarktvolumen ist als Mittelwert abgebildet \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$ versus der mit NaCl - behandelten Kontrollgruppe.

4.4.4 Korrigiertes Infarktvolumen

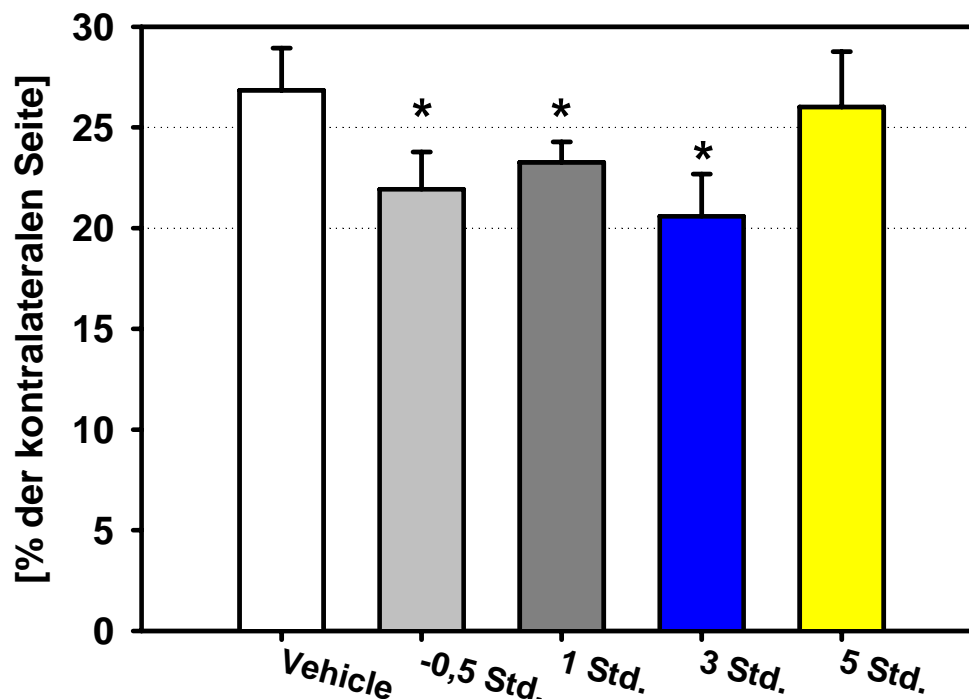
Durch die Berechnung des korrigierten Infarktvolumens schließt man Störgrößen wie z. B. die unterschiedliche Größe der Gehirne oder die ödembedingte Schwellung im Infarktgebiet aus der Berechnung der Infarktgröße aus. Es handelt sich um einen prozentualen Wert, der den Infarkt als Anteil der kontralateralen Gehirnhälfte angibt. Er berechnet sich aus dem Volumen beider Gehirnhälften und dem Infarktvolumen nach

folgender Rechnung:

$$\frac{\text{Gesamtvolumen kontralaterale Seite} - (\text{Gesamtvolumen ipsilaterale Seite} - \text{Infarktvolumen})}{\text{Gesamtvolumen kontralaterale Seite}}$$

Das ödemkorrigierte Infarktvolumen betrug $21,92\% \pm 5,88\%$ in der Gruppe $t = -0,5$ Std., $23,36\% \pm 3,07\%$ in der Gruppe $t = 1$ Std., Tiere der Versuchsgruppe $t = 3$ Std. wiesen ein ödemkorrigiertes Infarktvolumen von $20,59\% \pm 6,27\%$ auf, $t = 5$ Std. zeigte $26,02 \pm 8,68\%$ und bei der Kontrollgruppe ergab sich ein Wert von $26,84\% \pm 6,63\%$ (siehe Abb. 17). Dabei hatten die Versuchstiere der Gruppe $t = -0,5$ Std., $t = 1$ Std. und der Gruppe $t = 3$ Std. signifikant kleinere Infarktvolumina als die Kontrolltiere (Mann-Whitney Rank Sum Test, $p < 0,05$).

Abbildung 17: Ödemkorrigiertes Infarktvolumen

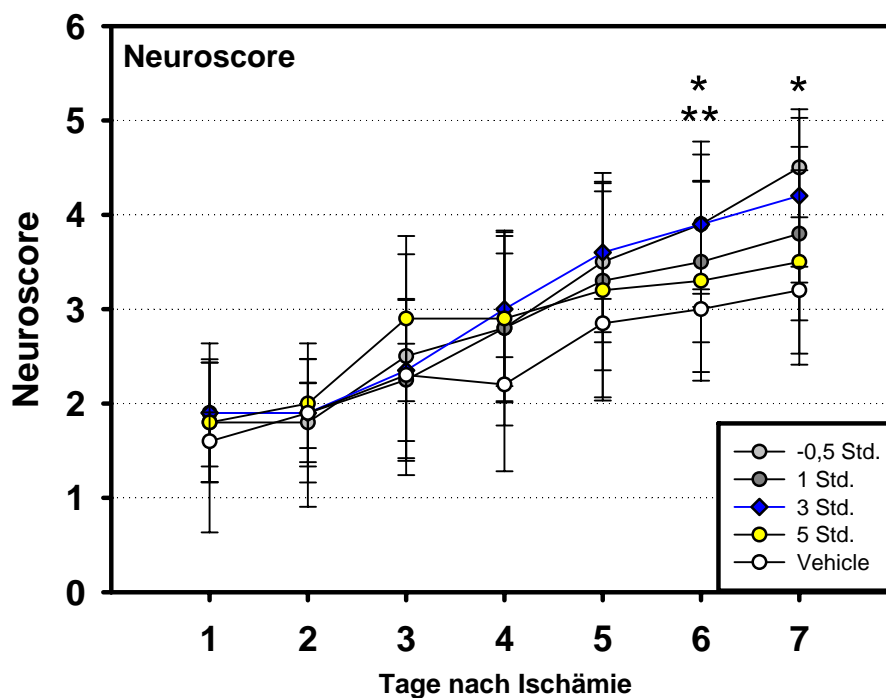


Das Infarktvolumen ist nach obiger Formel berechnet und als Mittelwert \pm Standardabweichung abgebildet. * $p < 0,05$ versus der mit NaCl - behandelten Kontrollgruppe.

4.5 Neuro-Score

Die Daten zeigen eine bessere funktionelle Erholung der Therapiegruppen bis einschließlich der $t = 5$ Std. (s. Abb. 18) im Vergleich zu der nur mit NaCl behandelten Kontrollgruppe. Der Effekt ist erst ab Tag vier nach Ischämie deutlich ausgeprägt und zeigt am sechsten Tag einen signifikanten Unterschied (Mann-Whitney Rank Sum Test, $p < 0,05$) zwischen den Gruppen $t = -0,5$ Std. und der Kontrollgruppe, sowie zwischen den Gruppen $t = 3$ Std. und der Kontrollgruppe. Am Tag sieben ließ sich bei den Tieren der Gruppe $t = -0,5$ Std. ein signifikant besserer neurologischer Befund im Vergleich mit den Tieren der Kontrollgruppe erheben (ANOVA on Ranks, Dunnet Test, $p < 0,05$).

Abbildung 18: Entwicklung des Neuro-Scores



Dargestellt ist die Erholung der neurologischen Funktion über einen siebentägigen Untersuchungszeitraum nach 90 minütiger fokaler zerebraler Ischämie. Abgebildet ist der Median der Gruppen mit zugehöriger Standardabweichung. Die Bewertung erfolgte nach folgendem Schema: fünf Punkte für neurologisch unauffällige Tiere, vier Punkte bei kontralateraler Vorderbeinflexion, verminderte Standstabilität bei seitlichem Druck ohne Circling drei Punkte, zwei Punkte für Circling nach Zug am Schwanz, einen Punkt für spontanes Circling und null Punkte bei keiner Spontanaktivität.

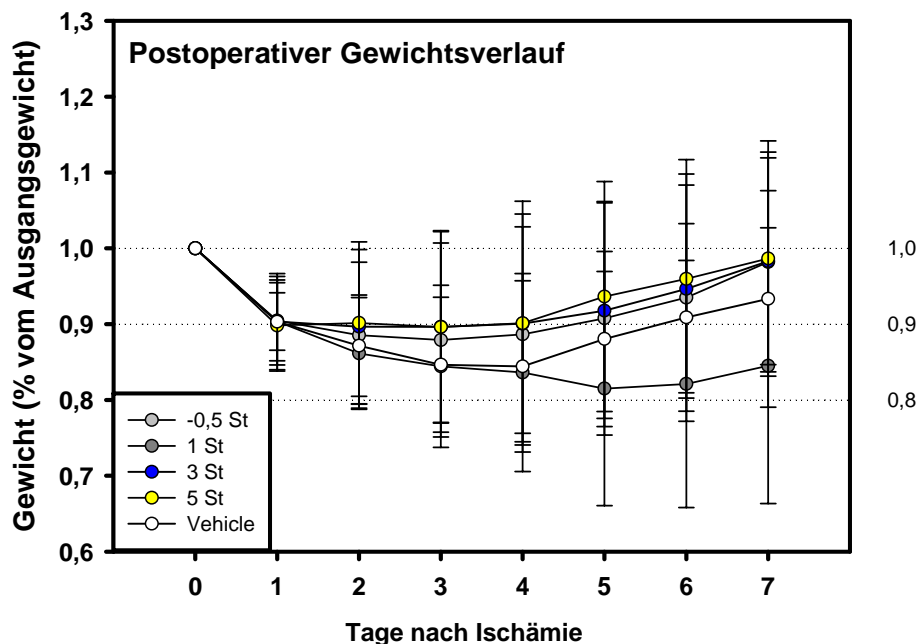
* $t = -0,5$ Std., ** $t = 3$ Std. $p < 0,05$ gegen Kontrollgruppe des gleichen Tages.

4.6 Gewicht

Die Tiere wurden täglich neben der Überprüfung auf ein neurologisches Defizit auch einer Gewichtsmessung unterzogen. Diese erfolgte immer morgens vor der Bestimmung des Neuro-Scores. Das Körpergewicht der Versuchstiere fiel am ersten postoperativen Tag auf unter 90% des Ausgangsgewichtes ab. Im weiteren Verlauf kam es zunächst zu einem weiteren Gewichtsabfall. Ab Tag drei nahmen die Versuchstiere jedoch deutlich wieder an Gewicht zu und übertrafen zum Teil sogar das Ausgangsgewicht. Ein signifikanter Unterschied in der Stärke der Gewichtszunahme zwischen den Versuchsgruppen lies sich ebenfalls nicht beobachten.

Die Gruppen $t = -0,5$ Std., $t = 3$ Std. und $t = 5$ Std. zeigten eine bessere Gewichtserholung als die Kontrollgruppe. Lediglich die Tiere der Gruppe $t = 1$ Std. zeigten ein schlechteres Ergebnis als die Kontrollgruppe. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Abbildung 19: Postoperativer Gewichtsverlauf



Abgebildet ist der Gewichtsverlauf der einzelnen Gruppen. Die Gewichtsmessung erfolgte täglich jeweils zur gleichen Zeit wie die Bestimmung des neurologischen Defizits. Es besteht keine Signifikanz zwischen den Versuchsgruppen.

5 DISKUSSION

In dieser Studie wurde das therapeutische Fenster des selektiven Bradykinin-B₂-Rezeptorantagonisten LF 16-0687 Ms auf das Infarktvolumen und die neurologische Erholung von Ratten nach temporärem Verschluss der A. cerebri media untersucht. Die Antagonisierung der Bradykininaktivität am B₂-Rezeptor resultierte in einem signifikant geringeren neurologischen Defizit und in einem signifikant geringeren Infarktvolumen.

5.1 Experimentelles Modell und Studiendesign

Mit diesem Studiendesign können unter anderem zwei wesentliche klinische Situationen nachgestellt werden: Der ischämische Schlaganfall mit Reperfusion und die temporäre Okklusion einer Arterie im Rahmen einer neurochirurgischen Operation. In einer 2001 veröffentlichten Studie ^[50] zeigte sich, dass bei 71% der Schlaganfallpatienten eine spontane Rekanalisation nach thrombolischem Verschluss erfolgt. Hinzu kommt ein immer größer werdende Einsatz von tPA zur Lyse bei Patienten mit embolischem Verschluss einer Hirnarterie ^[2]. Das 1986 von Koizumi et al. ^[40] entwickelte intraluminale Fadenmodell zur temporären fokalen zerebralen Ischämie mit Möglichkeit der Reperfusion des ischämischen Areals, welches 1989 von Longa et al. modifizierte wurde ^[44], stellt genau diese Situationen dar. Im Unterschied zum Modell des Verschlusses der A. cerebri media mittels offener Kraniotomie, beschrieben von Tamura et al. ^[74; 75], oder dem vom Busch et al. publizierten Modell ^[10], in dem durch Injektion mehrerer fibrinreicher autologer Thromben ein Verschluss der MCA erreicht wird, bietet dieses Modell mehrere Vorteile: Durch die minimal invasive Operationsmethode kann die Schädelkalotte geschlossen bleiben. Dieses Vorgehen verhindert eine Beeinflussung der Hirntemperatur und des intrakraniellen Druckes. Des Weiteren bleiben die Liquorzirkulation und die Blut - Hirn - Schranke unverändert. Ein für die Pathophysiologie nicht auszuschließender Vorgang ist die Reperfusion nach Ischämie. Dies kann durch einfaches Zurückziehen des Fadens erreicht werden und ist in anderen experimentellen Schlaganfallmodellen nicht möglich. Eine wie bei Busch et al. ^[10] geschilderte Aktivierung der körpereigenen Lysefaktoren findet beim intraluminale Fadenmodell nicht statt. Ein entscheidender Vorteil dieses Modells ist die hohe Reproduzierbarkeit.

Mögliche Fehlerquellen dieses Modells sind Subarachnoidalblutung (SAB) durch Perforation der Gefäßwand mit dem Verschlussfaden oder ein insuffizienter Verschluss der MCA bzw. eine verfrühte Reperfusion aufgrund einer spontanen Dislokation des Fadens. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit einer Thrombosierung des verschlossenen Gefäßabschnittes oder einer postischämischen Hyperthermie, beschrieben von Zhao et al. ^[83], die aber in dieser Studie nicht zu beobachten war, da die Ischämiezeit auf 90 Minuten beschränkt blieb ^[42; 66]. Auch kam es in Vorversuchen zu keiner Thrombosierung der Gefäße ^[66]. All diese Fehlerquellen sind jedoch sofort unter genauer Beobachtung des LCBF (SAB: beidseitiger LCBF - Abfall, vorzeitige bzw. fehlende Reperfusion: verfrühter bzw. nicht stattfindender LCBF - Anstieg) zu erkennen. Entsprechende Maßnahmen bis hin zum Ausschluss des Tieres aus der Versuchsreihe können dann noch intraoperativ ergriffen werden.

Die Messung der lokalen zerebralen Durchblutung mit der LDF erfolgt über die Erfassung des Produkts aus Erythrozytenkonzentration und –geschwindigkeit, dem sog. Laser-Doppler-Flux ^[23]. Diese Messung ergibt jedoch keine direkten Werte, sondern stellt nur relative Änderungen der mikrovaskulären Durchblutung in einem Gewebeareal von ca. 1 mm³ dar ^[18; 25]. Durch die zeitliche Auflösung von 2 Hz ist eine kontinuierliche Messung möglich. Somit kann sofort auf Veränderungen beim Fadenvorschub oder auf eine frühzeitige Reperfusion reagiert werden. Verglichen mit anderen Verfahren zur Messung der zerebralen Durchblutung konnte unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen eine gute Korrelation der Laser- Doppler Flowmetrie mit radioaktiven Mikrosphären, der Wasserstoffclearance oder der Autoradiographie dokumentiert werden ^[18; 20; 32].

Für diese Studie wurde ein B₂-Rezeptor-Antagonist in einer Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht verwendet. Grund dafür sind Daten aus unserer Arbeitsgruppe ^[45], die in einer Vorstudie erhoben wurden. Die neuroprotektive Dosis variiert von 36mg/kg bis 1 mg/kg/Tag. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Dosis von 1mg/kg/Tag genauso effektiv wie höhere Dosen ist. Wie schon von Stover et al. ^[73] gezeigt und von Zausinger et al. ^[82] bestätigt, genügt eine subkutane Applikation, um neuroprotektive Effekte zu erzielen. Dies ermöglicht eine Gabe der Substanz über mehrere Tage ohne erneute Anästhesierung der Tiere.

Zur Quantifizierung der Wirksamkeit von LF 16-0687 Ms wurden zwei unterschiedliche Parameter herangezogen: Das neurologische Defizit und das Infarktvolumen. In vielen Studien wird das Infarktvolumen als Hauptkriterium für die pharmakologische Wirksamkeit eines Wirkstoffes herangezogen. Das Infarktvolumen zeigt aber nur den morphologischen Schaden, nicht jedoch Funktionsverluste im Sinne einer verminderten synaptischen Übertragung. Daher empfiehlt sich, das Hauptaugenmerk nicht nur auf das Infarktvolumen zu richten, sondern besonders bei längeren Beobachtungszeiträumen den neurologischen Status der Versuchstiere zu erheben ^[15], da aus klinischer Sicht diesem Aspekt eine größere Relevanz zugesprochen wird. Erhoben wurde ein von Bederson et al. ^[6] beschriebener und von Zausinger et al. ^[81] modifizierter Neuroscore. Es bestand eine hohe Korrelation zwischen den gemessenen Infarktvolumina und dem erhobenen Neuroscore.

Zur Bestimmung des Infarktvolumens wurden am siebten postoperativen Tag die Gehirne transkardial perfusionsfixiert und entnommen. Für eine exakte Bestimmung des Infarktvolumens müssen histologische Schnitte aus mindestens acht äquidistanten Ebenen des Infarktes angefertigt werden ^[53]. Wie schon von Lin et al. ^[43] beschrieben, erscheint das Infarktvolumen aufgrund der Ausbildung eines Hirnödems größer. Um diesen Fehler auszugleichen, bietet sich die ödemkorrigierte Infarktvolumenberechnung an. Der erhaltene Prozentwert gibt das Infarktvolumen als Anteil der kontralateralen, gesunden Hemisphäre an.

5.2 Expression von B₂-Rezeptoren nach zerebraler Ischämie

Obwohl die Expression von Bradykinin-B₂-Rezeptoren in vitro in Astrozyten und Oligodendrozyten beschrieben wurde ^[14; 29; 35; 52; 71], ist eine kontinuierliche Expression in vivo bisher nur in Neuronen beschrieben worden ^[13; 30; 60]. Die Funktion dieser Rezeptoren im ZNS ist noch nicht völlig geklärt, aber sie scheinen keine entscheidende physiologische Rolle zu spielen, da Mäuse, denen Kinin-B₂-Rezeptoren fehlen, keinen ZNS-spezifischen Phänotyp aufweisen ^[8]. Unter pathophysiologischen Aspekten, wie z. B. der fokalen zerebralen Ischämie, kommt es allerdings zu einem deutlichen Anstieg der B₂-Rezeptor-Expression in ischämischen Hirnarealen ^[30]. Zusammen mit der Tatsache, dass B₂-Rezeptor-Knockoutmäuse so gut wie kein Hirnödem entwickelten,

mehren sich die Hinweise, dass Bradykinin-B₂-Rezeptoren eine entscheidende Rolle für den postischämischen Hirnschaden spielen ^[30].

5.3 LF 16-0687 Ms

LF 16-0687 Ms ist zurzeit einer der potentesten Antagonisten des humanen Bradykinin-B₂-Rezeptors. In einer Rezeptorbindungsstudie mit [³H] Bradykinin an humanen rekombinanten Bradykinin-B₂-Rezeptoren, sowie mit rekombinanten Bradykinin-B₂-Rezeptoren der Ratte und des Meerschweinchens wurden K_i-Werte von 0,67, 1,74 bzw. 1,37 nM ermittelt. Studien zur Untersuchung der Bindungs- und Funktionseigenschaften bei über 40 Rezeptoren offenbarten eine hohe Selektivität von LF 16-0687 Ms für den Bradykinin-B₂-Rezeptor ^[59]. Aufgrund der stabilen physiologischen Parameter wie z. B. dem systolischen Blutdruck nach Gabe von LF 16-0687 Ms ^[55; 58; 73] kann davon ausgegangen werden, dass LF 16-0687 Ms keine systemischen Nebenwirkungen hat.

5.4 Pharmakologische Bradykinin-B₂-Rezeptor Blockade

Die entscheidende Rolle, die Bradykinin-B₂-Rezeptoren beim postischämischen Hirnschaden spielen, wurde in verschiedenen pharmakologischen Studien belegt ^[16; 64; 82]. Proteinbasierende Inhibitoren ^[64] sowie Small-Molecules-Inhibitoren, wie in dieser Studie, wurden für diesen Zweck benutzt ^[16; 82]. Da Small-Molecules-Inhibitoren im Vergleich zu proteinbasierenden Inhibitoren im klinischen Alltag eine Reihe von praktischen Vorteilen besitzen, wie z. B. eine deutlich längere Stabilität bei Raumtemperatur, wurde ein spezifischer und bereits ausführlich beschriebener Small-Molecule-Bradykinin-B₂-Rezeptoren-Antagonist, LF 16-0687 Ms, für diese Studie verwendet ^[58; 59; 82]. LF 16-0687 Ms passiert die Blut-Hirnschranke, reduziert die Hirnödembildung, den Hirnschaden und verbessert die neurologische Funktion nach experimentellem traumatischem Hirnschaden ^[4; 16; 38; 39; 55; 72; 73] und zerebraler Ischämie bei Ratten und Mäusen ^[16; 82].

Da Schlaganfallpatienten erst mit einer beträchtlichen zeitlichen Verzögerung von oft mehreren Stunden medizinische Hilfe erhalten und dann noch eine zeitaufwendige Diagnostik durchlaufen, müssen potentielle Medikamente für die Behandlung des

Schlaganfalls ein Zeitfenster von mehreren Stunden haben. Bisher wurde nur gezeigt, dass Bradykinin-B₂-Rezeptoren-Antagonisten neuroprotektive Wirksamkeit besitzen, wenn sie innerhalb der ersten 30 Minuten nach Einsetzen der Ischämie gegeben werden [16; 30; 64; 82]. Obwohl diese Studien entscheidende Hinweise über die pathophysiologische Rolle von Bradykinin-B₂-Rezeptoren in der zerebralen Ischämie geben, ist bisher unklar, ob eine Antagonisierung von Bradykinin-B₂-Rezeptoren den Hirnschaden auch dann noch verringern kann, wenn die Gabe des Antagonisten um mehrere Stunden hinausgezögert wird.

Diese Studie zeigt, dass man durch eine Antagonisierung von Bradykinin-B₂-Rezeptoren mit einer Verzögerung von drei bis fünf Stunden nach Reperfusion einer 90 minütigen Ischämie, d. h. viereinhalb bzw. sechseinhalb Stunden nach Einsetzen der Ischämie, immer noch eine signifikante Reduzierung des ischämischen Hirnschadens und eine Verbesserung der neurologischen Funktion erzielen kann.

Zusätzlich zeigen unsere Daten, dass eine frühzeitige Antagonisierung von B₂-Rezeptoren, d. h. bereits eine Stunde nach Ischämiebeginn, einen größeren protektiven Effekt hat als eine spätere Behandlung. Dabei kann sogar eine Verkleinerung des Infarktolumens in den Basalganglien erzielt werden. Diese Daten passen gut zum zeitlichen Ablauf des Zelltodes in dem von uns benutzten Modell, d. h. aufgrund der Versorgung durch Endarterien tritt der Zelltod in den Basalganglien bereits in den ersten zwei Stunden nach Verschluss der A. cerebri media auf [28], während der Zelltod im Kortex verzögert auftritt [27]. Daher könnte eine frühe Antagonisierung des Bradykinin-B₂-Rezeptors sogar den Zelltod in den Basalganglien verhindern.

Die positiven Effekte wurden in verschiedensten Studien zu traumatischen Hirnläsionen bestätigt. Die Substanz reduziert das vasogen verursachte Hirnödem um 31% bei der Ratte mittels Kälteläsion auf dem exponierten Kortex [55]. Des Weiteren verbessert LF 16-0687 Ms das neurologische Outcome der Versuchstiere nach geschlossenem Schädeltrauma mit einer Reduktion des posttraumatischen Hirnödems um 50 – 70% [58].

5.5 Ausblick

Betrachtet man die Mechanismen, über die endogenes Bradykinin eine ischämische

Schädigung des Gehirns vermittelt, so liegt die Folgerung nahe, dass es auch zu einer Aktivierung von permanent exprimierten B₂-Rezeptoren kommt. Des Weiteren folgen eine Freisetzung von Arachidonsäuren und eine Aktivierung von Cyclo-Oxygenasen (COX). Dies führt zu einer Produktion von Prostanoiden, reaktiven Sauerstoffgruppen und zuletzt zu einer Peroxidation von Lipiden ^[9; 64; 65; 70]. Besonders der Punkt der Aktivierung von COX spielt im Hinblick auf die Wirksamkeit von LF 16-0687 Ms eine wichtige Rolle. Denn noch ist nicht klar, ob LF 16-0687 Ms seine Wirkung über eine Blockade von vaskulären oder neuronalen B₂-Rezeptoren vermittelt und wie entscheidend eine verminderte Aktivierung von COX-Enzymen auf das Outcome der Versuchstiere ist. Wie inzwischen von Iadecola et al. ^[37] gezeigt werden konnte, spielt COX-1 eine protektive Rolle in der zerebralen Ischämie, wohingegen COX-2 ^[36] einen schädigenden Einfluss auf das Geschehen nimmt. Vielleicht liegt die Wirksamkeit von LF 16-0687 Ms auch in einer Hemmung der COX-2 Aktivität. Demzufolge wäre es interessant zu untersuchen, ob LF 16-0687 Ms ähnliche neuroprotektive Potenz besitzt wie eine Hemmung von COX-2 ^[36] und ob die Kombination von LF 16-0687 Ms und Thrombolytika einen additiven Effekt besitzt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine selektive Blockade von Bradykinin-B₂-Rezeptoren mittels LF 16-0687 Ms eine ausgeprägte neuroprotektive Wirkung besitzt, selbst wenn die Behandlung bis zu fünf Stunden inhibiert wird. Wir glauben deswegen, dass eine klinische Prüfung dieser Substanz angezeigt ist.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die zerebrale Ischämie ist die dritthäufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern. Die heutigen Therapiemöglichkeiten sind sehr bebeschränkt und rechtfertigen die Suche nach neuen Therapeutika. Eine Therapieoption der zerebralen Ischämie liegt in der Hemmung des ischämischen Sekundärschadens, der sich mit einer Verzögerung von mehreren Stunden entwickelt. Dabei spielen sehr wahrscheinlich apoptotische als auch inflammatorische Mechanismen eine entscheidende Rolle. Einer der ersten inflammatorischen Mediatoren ist das Bradykinin.

Nach Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems wird Bradykinin von Kininogen abgespalten. Über Bradykinin-B₂-Rezeptoren kommt es dann im ischämischen Areal zur Vasodilatation und einer Steigerung der Gefäßpermeabilität. Die Steigerung der Gefäßpermeabilität zusammen mit der Vasodilatation führen zu Ausbildung eines Hirnödems. Dadurch kommt es zu einer Steigerung des intrakraniellen Drucks, die zusammen mit weiteren Mechanismen zu einer Vergrößerung des ischämischen Areals führt. Dieser Teil des sekundären Hirnschadens ist aufgrund seines verzögerten Einsetzens einer Therapie zugänglich.

In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Effekt eine Antagonisierung der Bradykinin-B₂-Rezeptoren mit dem hochselektiven Bradykinin-B₂-Rezeptoren-Antagonist LF 16-0687 Ms zu verschiedenen Zeitpunkten hat, und ob dadurch eine Verminderung des sekundären Hirnschadens zu erreichen ist.

Hierfür wurde mittels des intraluminalen Fadenmodells bei der Ratte eine fokale zerebrale Ischämie über 90 Minuten provoziert. Die Tiere wurden dazu mit Halothan narkotisiert und über den gesamten Operationszeitraum (ca. 4,5 Std.) beatmet. Zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten ($t = -0,5$ Std., $t = 1$ Std., $t = 3$ Std. und $t = 5$ Std.; $t = 0$ entspricht dem Ischämieende) wurde den Versuchstieren der Bradykinin-B₂-Rezeptor-Antagonist LF 16-0687 Ms appliziert. Die zweite Applikation erfolgte sechs Stunden nach der ersten Applikation am selben Tag. An den beiden folgenden Tagen wurde jeweils, auf morgens und nachmittags verteilt, eine weitere Dosis gespritzt. Die Gesamttagesdosis belief sich auf 1 mg/kg Körpergewicht pro Tag für drei Tage.

Ausgewertet wurden das Infarktvolumen, getrennt für Kortex und Basalganglien, nach

sieben Tagen, sowie täglich die neurologische Funktion (Neuroscore modifiziert nach Bederson) und das Körpergewicht.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte signifikante Unterschiede im Gesamt- und Basalganglieninfarktvolumen gegenüber der Kontrolle bei der Gruppe $t = -0,5$ Std. Bei Betrachtung des Kortexinfarktvolumens ergaben sich signifikante Abweichungen bei den Gruppen $t = 1$ Std. und $t = 5$ Std. Die anderen Gruppen wiesen auch beträchtliche Verkleinerungen des Infarktvolumens auf, jedoch keine Signifikanz. Bei der Untersuchung des Neuroscores fielen signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe $t = -0,5$ Std. und $t = 3$ Std. auf. Das Körpergewicht zeigte keine signifikanten Unterschiede. Eine Tendenz zu einer besseren Gewichtsentwicklung bei einer früheren Applikation von LF 16-0687 Ms ließ sich jedoch feststellen.

Zusammenfassend kann man sagen:

Eine pharmakologische Hemmung von B_2 -Rezeptoren verhindert bei intraischämischer Gabe den postischämischen Hirnschaden um 20% und verbessert die neurologische Funktion signifikant.

Auch die Behandlung mit einer Verzögerung von ein bis fünf Std. nach Reperfusion kann den sekundären Hirnschaden verhindern (-15 bis 25%).

Diese Ergebnisse demonstrieren die Wirksamkeit von LF 16-0687 Ms und bestätigen, dass Bradykinin B_2 -Rezeptoren maßgeblich an der Pathophysiologie des postischämischen Zelltodes beteiligt sind. Die Hemmung von B_2 -Rezeptoren mit einem klinisch einsetzbaren Antagonisten verbessert das Outcome nach experimentellem Schlaganfall, auch wenn die Applikation um bis zu fünf Stunden verzögert wird.

Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint es daher sinnvoll, die Wirkung von Bradykinin B_2 -Rezeptorantagonisten in einer klinischen Studie zu überprüfen.

7 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: LF 16-0687 Ms | 15 |
| Abbildung 2: Versuchsaufbau | 18 |
| Abbildung 3: Orotrachealer Tubus | 21 |
| Abbildung 4: Versuchsaufbau | 22 |
| Abbildung 5: Laser-Doppler Sonden Platzierung..... | 23 |
| Abbildung 6: Okklusion der A. cerebri media..... | 24 |
| Abbildung 7: pH-Wert | 28 |
| Abbildung 8: pCO ₂ | 28 |
| Abbildung 9: pO ₂ | 29 |
| Abbildung 10: Sauerstoffsättigung | 29 |
| Abbildung 11: MAP..... | 30 |
| Abbildung 12: Rektale und temporale Körpertemperatur | 31 |
| Abbildung 13: Laser-Doppler-Flow | 32 |
| Abbildung 14: Histologischer Schnitt zur Auswertung der Infarktvolumina..... | 34 |
| Abbildung 15: Gesamtinfarktvolumen aller Gruppen | 35 |
| Abbildung 16: Infarktvolumen Basalganglien & Kortex | 36 |
| Abbildung 17: Ödemkorrigiertes Infarktvolumen | 37 |
| Abbildung 18: Entwicklung des Neuro-Scores | 38 |
| Abbildung 19: Postoperativer Gewichtsverlauf..... | 39 |

8 VERZEICHNIS DER TABELLEN

| | |
|------------------------------------|----|
| Tabelle 1: Gruppeneinteilung | 18 |
| Tabelle 2: Applikationsschema..... | 19 |
| Tabelle 3: Neuro-Score | 25 |

9 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

| | |
|------|------------------------------------------------------------|
| ATP | Adenosin TriPhosphat |
| ICF | Institut für Chirurgische Forschung |
| LCBF | Lokaler cerebraler Blutfluß |
| LDF | Laser Doppler Flow |
| MAP | Mittlerer arterieller Druck (mean arterial blood pressure) |
| MCA | Middle cerebral artery (A. cerebri media) |
| MCAO | MCA-Okklusion |
| POT | postoperativer Tag |
| SAB | Subarachnoidalblutung |

10 ANHANG

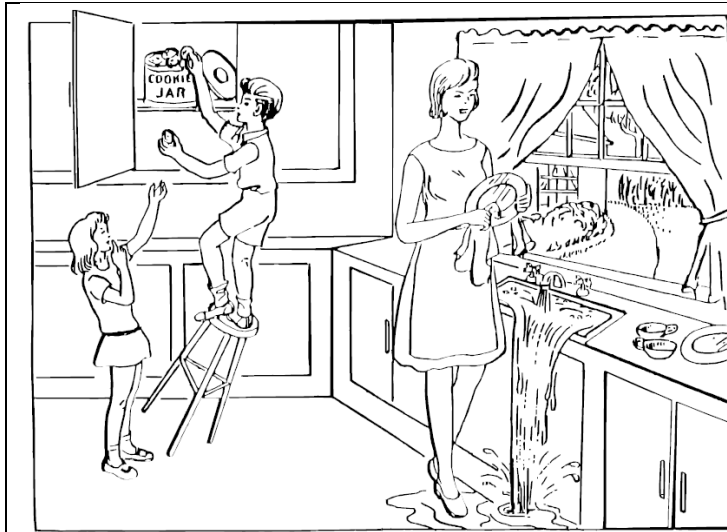
10.1 NIH Stroke Scale

Administer stroke scale items in the order listed. Record performance in each category after each subscale exam. Do not go back and change scores. Follow directions provided for each exam technique. Scores should reflect what the patient does, not what the clinician thinks the patient can do. The clinician should record answers while administering the exam and work quickly. Except where indicated, the patient should not be coached (i.e., repeated requests to patient to make a special effort).

| | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1a. Level of Consciousness: The investigator must choose a response if a full evaluation is prevented by such obstacles as an endotracheal tube, language barrier, orotracheal trauma/bandages. A 3 is scored only if the patient makes no movement (other than reflexive posturing) in response to noxious stimulation. | <p>0 = Alert; keenly responsive.</p> <p>1 = Not alert; but arousable by minor stimulation to obey, answer, or respond.</p> <p>2 = Not alert; requires repeated stimulation to attend, or is obtunded and requires strong or painful stimulation to make movements (not stereotyped).</p> <p>3 = Responds only with reflex motor or autonomic effects or totally unresponsive, flaccid, and flexic.</p> | _____ |
| 1b. LOC Questions: The patient is asked the month and his/her age. The answer must be correct - there is no partial credit for being close. Aphasic and stuporous patients who do not comprehend the questions will score 2. Patients unable to speak because of endotracheal intubation, orotracheal trauma, severe dysarthria from any cause, language barrier, or any other problem not secondary to aphasia are given a 1. It is important that only the initial answer be graded and that the examiner not "help" the patient with verbal or non-verbal cues. | <p>0 = Answers both questions correctly.</p> <p>1 = Answers one question correctly.</p> <p>2 = Answers neither question correctly.</p> | _____ |
| 1c. LOC Commands: The patient is asked to open and close the eyes and then to grip and release the non-paretic hand. Substitute another one step command if the hands cannot be used. Credit is given if an unequivocal attempt is made but not completed due to weakness. If the patient does not respond to command, the task should be demonstrated to him or her (pantomime), and the result scored (i.e., follows none, one or two commands). Patients with trauma, amputation, or other physical impediments should be given suitable one-step commands. Only the first attempt is scored. | <p>0 = Performs both tasks correctly.</p> <p>1 = Performs one task correctly.</p> <p>2 = Performs neither task correctly.</p> | _____ |
| 2. Best Gaze: Only horizontal eye movements will be tested. Voluntary or reflexive (oculocephalic) eye movements will be scored, but caloric testing is not done. If the patient has a conjugate deviation of the eyes that can be overcome by voluntary or reflexive activity, the score will be 1. If a patient has an isolated peripheral nerve palsy (CN III, IV or VI), score a 1. Gaze is testable in all aphasic patients. Patients with ocular trauma, bandages, pre-existing blindness, or other disorder of visual acuity or fields should be tested with reflexive movements, and a choice made by the investigator. Establishing eye contact and then moving about the patient from side to side will occasionally clarify the presence of a partial gaze palsy. | <p>0 = Normal.</p> <p>1 = Partial gaze palsy; gaze is abnormal in one or both eyes, but forced deviation or total gaze paresis is not present.</p> <p>2 = Forced deviation, or total gaze paresis not overcome by the oculocephalic maneuver.</p> | _____ |
| 3. Visual: Visual fields (upper and lower quadrants) are | 0 = No visual loss. | _____ |

| | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| tested by confrontation, using finger counting or visual threat, as appropriate. Patients may be encouraged, but if they look at the side of the moving fingers appropriately, this can be scored as normal. If there is unilateral blindness or enucleation, visual fields in the remaining eye are scored. Score 1 only if a clear-cut asymmetry, including quadrantanopia, is found. If patient is blind from any cause, score 3. Double simultaneous stimulation is performed at this point. If there is extinction, patient receives a 1, and the results are used to respond to item 11. | 1 = Partial hemianopia. 2 = Complete hemianopia. 3 = Bilateral hemianopia (blind including cortical blindness). | |
| 4. Facial Palsy: Ask – or use pantomime to encourage – the patient to show teeth or raise eyebrows and close eyes. Score symmetry of grimace in response to noxious stimuli in the poorly responsive or non-comprehending patient. If facial trauma/bandages, orotracheal tube, tape or other physical barriers obscure the face, these should be removed to the extent possible. | 0 = Normal symmetrical movements. 1 = Minor paralysis (flattened nasolabial fold, asymmetry on smiling). 2 = Partial paralysis (total or near-total paralysis of lower face). 3 = Complete paralysis of one or both sides (absence of facial movement in the upper and lower face). | |
| 5. Motor Arm: The limb is placed in the appropriate position: extend the arms (palms down) 90 degrees (if sitting) or 45 degrees (if supine). Drift is scored if the arm falls before 10 seconds. The aphasic patient is encouraged using urgency in the voice and pantomime, but not noxious stimulation. Each limb is tested in turn, beginning with the non-paretic arm. Only in the case of amputation or joint fusion at the shoulder, the examiner should record the score as untestable (UN), and clearly write the explanation for this choice. | 0 = No drift; limb holds 90 (or 45) degrees for full 10 seconds. 1 = Drift; limb holds 90 (or 45) degrees, but drifts down before full 10 seconds; does not hit bed or other support. 2 = Some effort against gravity; limb cannot get to or maintain (if cued) 90 (or 45) degrees, drifts down to bed, but has some effort against gravity. 3 = No effort against gravity; limb falls. 4 = No movement. UN = Amputation or joint fusion, explain: _____ 5a. Left Arm 5b. Right Arm | _____ |
| 6. Motor Leg: The limb is placed in the appropriate position: hold the leg at 30 degrees (always tested supine). Drift is scored if the leg falls before 5 seconds. The aphasic patient is encouraged using urgency in the voice and pantomime, but not noxious stimulation. Each limb is tested in turn, beginning with the non-paretic leg. Only in the case of amputation or joint fusion at the hip, the examiner should record the score as untestable (UN), and clearly write the explanation for this choice. | 0 = No drift; leg holds 30-degree position for full 5 seconds. 1 = Drift; leg falls by the end of the 5-second period but does not hit bed. 2 = Some effort against gravity; leg falls to bed by 5 seconds, but has some effort against gravity. 3 = No effort against gravity; leg falls to bed immediately. 4 = No movement. UN = Amputation or joint fusion, explain: _____ 6a. Left Leg 6b. Right Leg | _____ |
| 7. Limb Ataxia: This item is aimed at finding evidence of a unilateral cerebellar lesion. Test with eyes open. In case of visual defect, ensure testing is done in intact visual field. The finger-nose-finger and heel-shin tests are performed on both sides, and ataxia is scored only if present out of proportion to weakness. Ataxia is absent in the patient who cannot understand or is paralyzed. Only in the case of amputation or joint fusion, the examiner should record the score as untestable (UN), and clearly write the explanation for this choice. In case of blindness, test by having the patient touch nose from extended arm position. | 0 = Absent. 1 = Present in one limb. 2 = Present in two limbs. UN = Amputation or joint fusion, explain: _____ | _____ |
| 8. Sensory: Sensation or grimace to pinprick when tested, or withdrawal from noxious stimulus in the obtunded or aphasic patient. Only sensory loss attributed to stroke is scored as abnormal and the examiner should test as many body areas (arms [not hands], legs, trunk, face) as needed to accurately check for hemisensory loss. A score of 2, "severe or total | 0 = Normal; no sensory loss. 1 = Mild-to-moderate sensory loss; patient feels pinprick is less sharp or is dull on the affected side; or there is a loss of superficial pain with pinprick, but patient is aware of being touched. 2 = Severe to total sensory loss; patient is not | _____ |

| | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <p>sensory loss," should only be given when a severe or total loss of sensation can be clearly demonstrated. Stuporous and aphasic patients will, therefore, probably score 1 or 0. The patient with brainstem stroke who has bilateral loss of sensation is scored 2. If the patient does not respond and is quadriplegic, score 2. Patients in a coma (item 1a=3) are automatically given a 2 on this item.</p> | <p>aware of being touched in the face, arm, and leg.</p> | |
| <p>9. Best Language: A great deal of information about comprehension will be obtained during the preceding sections of the examination. For this scale item, the patient is asked to describe what is happening in the attached picture, to name the items on the attached naming sheet and to read from the attached list of sentences. Comprehension is judged from responses here, as well as to all of the commands in the preceding general neurological exam. If visual loss interferes with the tests, ask the patient to identify objects placed in the hand, repeat, and produce speech. The intubated patient should be asked to write. The patient in a coma (item 1a=3) will automatically score 3 on this item. The examiner must choose a score for the patient with stupor or limited cooperation, but a score of 3 should be used only if the patient is mute and follows no one-step commands.</p> | <p>0 = No aphasia; normal. 1 = Mild-to-moderate aphasia; some obvious loss of fluency or facility of comprehension, without significant limitation on ideas expressed or form of expression. Reduction of speech and/or comprehension, however, makes conversation about provided materials difficult or impossible. For example, in conversation about provided materials, examiner can identify picture or naming card content from patient's response. 2 = Severe aphasia; all communication is through fragmentary expression; great need for inference, questioning, and guessing by the listener. Range of information that can be exchanged is limited; listener carries burden of communication. Examiner cannot identify materials provided from patient response. 3 = Mute, global aphasia; no usable speech or auditory comprehension.</p> | <p>_____</p> |
| <p>10. Dysarthria: If patient is thought to be normal, an adequate sample of speech must be obtained by asking patient to read or repeat words from the attached list. If the patient has severe aphasia, the clarity of articulation of spontaneous speech can be rated. Only if the patient is intubated or has other physical barriers to producing speech, the examiner should record the score as untestable (UN), and clearly write an explanation for this choice. Do not tell the patient why he or she is being tested.</p> | <p>0 = Normal. 1 = Mild-to-moderate dysarthria; patient slurs at least some words and, at worst, can be understood with some difficulty. 2 = Severe dysarthria; patient's speech is so slurred as to be unintelligible in the absence of or out of proportion to any dysphasia, or is mute/anarthric. UN = Intubated or other physical barrier, explain: _____</p> | <p>_____</p> |
| <p>11. Extinction and Inattention (formerly Neglect): Sufficient information to identify neglect may be obtained during the prior testing. If the patient has a severe visual loss preventing visual double simultaneous stimulation, and the cutaneous stimuli are normal, the score is normal. If the patient has aphasia but does appear to attend to both sides, the score is normal. The presence of visual spatial neglect or anosagnosia may also be taken as evidence of abnormality. Since the abnormality is scored only if present, the item is never untestable.</p> | <p>0 = No abnormality. 1 = Visual, tactile, auditory, spatial, or personal inattention or extinction to bilateral simultaneous stimulation in one of the sensory modalities. 2 = Profound hemi-inattention or extinction to more than one modality; does not recognize own hand or orients to only one side of space.</p> | <p>_____</p> |



You know how.
Down to earth.
I got home from work.
Near the table in the dining room.
They heard him speak on the
radio last night.



MAMA
TIP – TOP
FIFTY – FIFTY
THANKS
HUCKLEBERRY
BASEBALL PLAYER

10.2 Verwendete Materialien, Geräte, Substanzen, Programme

10.2.1 Verwendete Geräte

AB Ac 025/TI/335/D 40/2 AB K/2 m, THERMOCOAX, Philips Industrial Electronics GmbH, Deutschland

Blutgasanalyse, Chiron Diagnostics 860, Bayer Health Care, Deutschland

Bohrer, Voltcraft NG 15

Halothan Vapor 19.1, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland

Heizplatte, Homeothermic Blanket Control Unit, Harvard Apparatus, USA

Industrial Controller Version 407, Philips Prozess- und Maschinen-Automation GmbH, Deutschland (unabhängige Regelkreise)

Laser-Doppler Sonden, Spezialanfertigung, Medizintechnik Lawrenz, Deutschland

Kyrostat Microm HM 560

Mikrowaage, AG 245 Mettler Toledo

Oxydig, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland

Perfusionsmessgerät, MBF3D, Moor Instruments Ltd., England

Perfusor, sp100i syringe pump, WPI, USA

Pressure Controlled Respirator, RSP 1102, Kent Scientific Corporation, USA ^[80]

Stereotax, Model 900, David Kopf Instruments, USA

Waage, Mettler PL1200

10.2.2 Chemikalien

2% Paraformaldehyd

Äther

Halothan (4 Vol %) U.S.P. 250 ml, Halocarbon Laboratories, River Edge, USA

Lachgas (N₂O)

Sauerstoff (O₂)

Stickstoff (N₂)

10.2.3 Medikamente

Atropin[®]

Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Hoffman - La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, D

KCl⁻

LF 16-0687 Ms

NaCl 0,9%, Delta Select GmbH, Pfullingen, Deutschland

10.2.4 Operationsmaterialien

4-0 Prolene Faden, Ethicon GmbH, Deutschland

Blutentnahmeröhrchen, Multi Cap, Bayer Corporation, East Walpole, USA

Kanüle, Sterican Gr. 20 Ø 0,40mm x 20 mm, Braun AG, Melsangen, Deutschland

Kanülentubus (Abb.)

Katheter, Portex Non Sterile Polyethylen Tubing Ø28mm, Portex, England

Kompressen, NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. Co. KG, Wetter, Deutschland

Präparationsbesteck

Silikonzylinder, Rhodorsil RTV 1556 A and B Pink, Rhône-Poulenc, Frankreich

Skalpel, Feather Disposable Scalpel Sterile No. 20, Feather Safety Razor Co,

Spritze, Injekt 2 ml, Luer Solo, Braun AG, Melsangen, Deutschland

Wattestäbchen, NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. Co. KG, Wetter, Deutschland

10.2.5 Programme

DasyLab32 V.5.03.33, Datalog GmbH, Deutschland

FlexPro 6.0, Weisang GmbH & Co. KG, St. Ingbert, Deutschland

Microsoft Excel ® 2003, Microsoft, USA

Microsoft Word ® 2003, Microsoft, USA

OPTIMAS 5.1, BioScan Inc., Edmonds, WA, USA

Reference Manager Version 10.0, ISI Researchsoft

Sigma Plot 2002 for Windows Version 8.0, SPSS Inc.

Sigma Stat for Windows Version 2.03, SPSS Inc.

10.2.6 Statistische Tests

ANOVA on Ranks

Dunnet Test

Mann – Whitney Rank Sum Test

Student – Newman – Keul Test

11 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Adams HP, Jr., Adams RJ, Brott T, del Zoppo GJ, Furlan A, Goldstein LB, Grubb RL, Higashida R, Kidwell C, Kwiatkowski TG, Marler JR and Hademenos GJ.** Guidelines for the early management of patients with ischemic stroke: A scientific statement from the Stroke Council of the American Stroke Association. *Stroke* 34: 1056-1083, 2003.
2. **Alexandrov AV, Burgin WS, Demchuk AM, El Mitwalli A and Grotta JC.** Speed of intracranial clot lysis with intravenous tissue plasminogen activator therapy: sonographic classification and short-term improvement. *Circulation* 103: 2897-2902, 2001.
3. **American Heart Association.** Heart Disease and Stroke Statistics - Update. 2005.
4. **Asa I, Ivashkova Y, Artru AA, Lifshitz M, Gavrilov V, Azab AN, Kapuler V, Alouchin A, Rachinsky M, Pruneau D, Shapira Y and Kaplanski J.** LF 16-0687 Ms, a new bradykinin B2 receptor antagonist, improves neurologic outcome but not brain tissue prostaglandin E2 release in a rat model of closed head trauma combined with ethanol intoxication. *J Trauma* 54: 881-887, 2003.
5. **AWMF online.** Akute zerebrale Ischämie Update 2000 nach EUSI-Empfehlungen. 2002.

6. **Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL and Bartkowski H.** Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17: 472-476, 1986.
7. **Bhoola KD, Figueroa CD and Worthy K.** Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 44: 1-80, 1992.
8. **Borkowski JA, Ransom RW, Seabrook GR, Trumbauer M, Chen H, Hill RG, Strader CD and Hess JF.** Targeted disruption of a B2 bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. *J Biol Chem* 270: 13706-13710, 1995.
9. **Brian JE, Jr., Faraci FM and Moore SA.** COX-2-dependent delayed dilatation of cerebral arterioles in response to bradykinin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2023-H2029, 2001.
10. **Busch E, Kruger K and Hossmann KA.** Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat. *Brain Res* 778: 16-24, 1997.
11. **Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Valdes I, Scheinberg P and Ginsberg MD.** Small differences in intranscemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 7: 729-738, 1987.

12. **Busto R, Globus MY, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I and Ginsberg MD.** Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke* 20: 904-910, 1989.
13. **Chen EY, Emerich DF, Bartus RT and Kordower JH.** B2 bradykinin receptor immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* 427: 1-18, 2000.
14. **Cholewinski AJ, Stevens G, McDermott AM and Wilkin GP.** Identification of B2 bradykinin binding sites on cultured cortical astrocytes. *J Neurochem* 57: 1456-1458, 1991.
15. **Corbett D and Nurse S.** The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Prog Neurobiol* 54: 531-548, 1998.
16. **Ding-Zhou L, Margaill I, Palmier B, Pruneau D, Plotkine M and Marchand-Verrecchia C.** LF 16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, reduces ischemic brain injury in a murine model of transient focal cerebral ischemia. *Br J Pharmacol* 139: 1539-1547, 2003.
17. **Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M and Pulsinelli W.** Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 9: 589-596, 1989.
18. **Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M and Pulsinelli W.** Continuous measurement

- of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 9: 589-596, 1989.
19. **Ellis EF, Chao J and Heizer ML.** Brain kininogen following experimental brain injury: evidence for a secondary event. *J Neurosurg* 71: 437-442, 1989.
20. **Eyre JA, Essex TJ, Flecknell PA, Bartholomew PH and Sinclair JI.** A comparison of measurements of cerebral blood flow in the rabbit using laser Doppler spectroscopy and radionuclide labelled microspheres. *Clin Phys Physiol Meas* 9: 65-74, 1988.
21. **Firlik AD, Yonas H, Kaufmann AM, Wechsler LR, Jungreis CA, Fukui MB and Williams RL.** Relationship between cerebral blood flow and the development of swelling and life-threatening herniation in acute ischemic stroke. *J Neurosurg* 89: 243-249, 1998.
22. **Francel PC.** Bradykinin and neuronal injury. *J Neurotrauma* 9 Suppl 1: S27-S45, 1992.
23. **Frerichs KU and Feuerstein GZ.** Laser-Doppler flowmetry. A review of its application for measuring cerebral and spinal cord blood flow. *Mol Chem Neuropathol* 12: 55-70, 1990.
24. **Frey EK and Kraut H.** Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung. *Arch*

Exp Pathol Pharmacol 133: 1-56, 1928.

25. **Fukuda O, Endo S, Kuwayama N, Harada J and Takaku A.** The characteristics of laser-Doppler flowmetry for the measurement of regional cerebral blood flow. *Neurosurgery* 36: 358-364, 1995.
26. **Ganten D. and Ruckpaul K.** *Handbuch der molekularen Medizin, Band 5, Erkrankungen des Zentralnervensystems.* Berlin: Springer Verlag, 1999.
27. **Garcia JH.** The evolution of brain infarcts. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 51: 387-393, 1992.
28. **Garcia JH, Yoshida Y, Chen H, Li Y, Zhang ZG, Lian J, Chen S and Chopp M.** Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 142: 623-635, 1993.
29. **Gimpl G, Walz W, Ohlemeyer C and Kettenmann H.** Bradykinin receptors in cultured astrocytes from neonatal rat brain are linked to physiological responses. *Neurosci Lett* 144: 139-142, 1992.
30. **Groeger M., Lebesgue D, Pruneau D, Relton J, Kim SW, Nussberger J and Plesnila N.** Release of Bradykinin and Expression of Kinin B2 Receptors in the Brain - Role for Cell Death and Brain Edema Formation after focal Cerebral Ischemia in Mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 978-989, 2005.

31. **Haberl RL, Heizer ML and Ellis EF.** Laser-Doppler assessment of brain microcirculation: effect of local alterations. *Am J Physiol* 256: H1255-H1260, 1989.
32. **Haberl RL, Heizer ML and Ellis EF.** Laser-Doppler assessment of brain microcirculation: effect of local alterations. *Am J Physiol* 256: H1255-H1260, 1989.
33. **Hacke W, Brott T, Caplan L, Meier D, Fieschi C, von KR, Donnan G, Heiss WD, Wahlgren NG, Spranger M, Boysen G and Marler JR.** Thrombolysis in acute ischemic stroke: controlled trials and clinical experience. *Neurology* 53: S3-14, 1999.
34. **Hall JM.** Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol Ther* 56: 131-190, 1992.
35. **Hosli E and Hosli L.** Autoradiographic localization of binding sites for neuropeptide Y and bradykinin on astrocytes. *Neuroreport* 4: 159-162, 1993.
36. **Iadecola C, Niwa K, Nogawa S, Zhao X, Nagayama M, Araki E, Morham S and Ross ME.** Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1294-1299, 2001.

37. **Iadecola C, Sugimoto K, Niwa K, Kazama K and Ross ME.** Increased susceptibility to ischemic brain injury in cyclooxygenase-1-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 1436-1441, 2001.

38. **Kaplanski J, Asa I, Artru AA, Azez A, Ivashkova Y, Rudich Z, Pruneau D and Shapira Y.** LF 16-0687 Ms, a new bradykinin B2 receptor antagonist, decreases ex vivo brain tissue prostaglandin E2 synthesis after closed head trauma in rats. *Resuscitation* 56: 207-213, 2003.

39. **Kaplanski J, Pruneau D, Asa I, Artru AA, Azez A, Ivashkova Y, Rudich Z and Shapira Y.** LF 16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, reduces brain edema and improves long-term neurological function recovery after closed head trauma in rats. *J Neurotrauma* 19: 953-964, 2002.

40. **Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T and Ooneda G.** Experimental studies of ischemic brain edema: A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* 8: 1-8, 1986.

41. **Krieger DW, Demchuk AM, Kasner SE, Jauss M and Hantson L.** Early clinical and radiological predictors of fatal brain swelling in ischemic stroke. *Stroke* 30: 287-292, 1999.

42. **Li F, Omae T and Fisher M.** Spontaneous hyperthermia and its mechanism in

- the intraluminal suture middle cerebral artery occlusion model of rats. *Stroke* 30: 2464-2470, 1999.
43. **Lin TN, He YY, Wu G, Khan M and Hsu CY.** Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. *Stroke* 24: 117-121, 1993.
44. **Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S and Cummins R.** Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20: 84-91, 1989.
45. **Lumenta DB, Plesnila N, Klasner B, Baethmann A, Pruneau D, Schmid-Elsaesser R and Zausinger S.** Neuroprotective effects of a postischemic treatment with a bradykinin B(2) receptor antagonist in a rat model of temporary focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1069: 227-234, 2006.
46. **Makevnina LG, Lomova IP, Zubkov Y and Semenyutin VB.** Kininogen consumption in cerebral circulation of humans during brain ischemia and postischemic reperfusion. *Braz J Med Biol Res* 27: 1955-1963, 1994.
47. **Marceau F, Hess JF and Bachvarov DR.** The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 50: 357-386, 1998.
48. **Miyazawa T and Hossmann KA.** Methodological requirements for accurate measurements of brain and body temperature during global forebrain ischemia

- of rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 12: 817-822, 1992.
49. **Miyazawa T and Hossmann KA.** Methodological requirements for accurate measurements of brain and body temperature during global forebrain ischemia of rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 12: 817-822, 1992.
50. **Molina CA, Montaner J, Abilleira S, Ibarra B, Romero F, Arenillas JF and Alvarez-Sabin J.** Timing of spontaneous recanalization and risk of hemorrhagic transformation in acute cardioembolic stroke. *Stroke* 32: 1079-1084, 2001.
51. **Müller TB, Haraldseth O and Unsgard G.** Characterization of the microcirculation during ischemia and reperfusion in the penumbra of a rat model of temporary middle cerebral artery occlusion: a laser Doppler flowmetry study. *Int J Microcirc Clin Exp* 14: 289-295, 1994.
52. **Noda M, Kariura Y, Amano T, Manago Y, Nishikawa K, Aoki S and Wada K.** Expression and function of bradykinin receptors in microglia. *Life Sci* 72: 1573-1581, 2003.
53. **Osborne KA, Shigeno T, Balarsky AM, Ford I, McCulloch J, Teasdale GM and Graham DI.** Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischaemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50: 402-410, 1987.
54. **Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jefthinija K, Jefthinija S and Haydon PG.**

Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369: 744-747, 1994.

55. **Plesnila N, Schulz J, Stoffel M, Eriskat J, Pruneau D and Baethmann A.**

Role of bradykinin B2 receptors in the formation of vasogenic brain edema in rats. *J Neurotrauma* 18: 1049-1058, 2001.

56. **Pluta R, Lossinsky AS, Mossakowski MJ, Faso L and Wisniewski HM.**

Reassessment of a new model of complete cerebral ischemia in rats. Method of induction of clinical death, pathophysiology and cerebrovascular pathology.

Acta Neuropathol (Berl) 83: 1-11, 1991.

57. **Proud D, MacGlashan DW, Jr., Newball HH, Schulman ES and**

Lichtenstein LM. Immunoglobulin E-mediated release of a kininogenase from purified human lung mast cells. *Am Rev Respir Dis* 132: 405-408, 1985.

58. **Pruneau D, Chorny I, Benkovitz V, Artru A, Roitblat L and Shapira Y.**

Effect of LF 16-0687MS, a new nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist, in a rat model of closed head trauma. *J Neurotrauma* 16: 1057-1065, 1999.

59. **Pruneau D, Paquet JL, Luccarini JM, Defrene E, Fouchet C, Franck RM,**

Loillier B, Robert C, Belichard P, Duclos H, Cremers B and Dodey P.

Pharmacological profile of LF 16-0687, a new potent non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist. *Immunopharmacology* 43: 187-194, 1999.

60. **Raidoo DM, Ramchurren N, Naidoo Y, Naidoo S, Muller-Esterl W and Bhoola KD.** Visualisation of bradykinin B2 receptors on human brain neurons. *Immunopharmacology* 33: 104-107, 1996.
61. **Raidoo DM, Ramsaroop R, Naidoo S and Bhoola KD.** Regional distribution of tissue kallikrein in the human brain. *Immunopharmacology* 32: 39-47, 1996.
62. **Regoli D, Nsa AS, Rizzi A and Gobeil FJ.** Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol* 348: 1-10, 1998.
63. **Reith J, Jorgensen HS, Pedersen PM, Nakayama H, Raaschou HO, Jeppesen LL and Olsen TS.** Body temperature in acute stroke: relation to stroke severity, infarct size, mortality, and outcome. *Lancet* 347: 422-425, 1996.
64. **Relton JK, Beckey VE, Hanson WL and Whalley ET.** CP-0597, a selective bradykinin B2 receptor antagonist, inhibits brain injury in a rat model of reversible middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 28: 1430-1436, 1997.
65. **Sarker MH, Hu DE and Fraser PA.** Acute effects of bradykinin on cerebral microvascular permeability in the anaesthetized rat. *J Physiol* 528 Pt 1: 177-187, 2000.
66. **Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A and Reulen HJ.** A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal

- cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry. *Stroke* 29: 2162-2170, 1998.
67. **Scicli AG, Forbes G, Nolly H, Dujovny M and Carretero OA.** Kallikrein-kinins in the central nervous system. *Clin Exp Hypertens A* 6: 1731-1738, 1984.
68. **Siesjo BK.** Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg* 77: 169-184, 1992.
69. **Siesjo BK.** Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg* 77: 337-354, 1992.
70. **Sobey CG, Heistad DD and Faraci FM.** Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate K⁺ channels. *Stroke* 28: 2290-2294, 1997.
71. **Stephens GJ, Marriott DR, Djamgoz MB and Wilkin GP.** Electrophysiological and biochemical evidence for bradykinin receptors on cultured rat cortical oligodendrocytes. *Neurosci Lett* 153: 223-226, 1993.
72. **Stover JF, Dohse NK and Unterberg AW.** Bradykinin 2 receptor antagonist LF 16-0687Ms reduces posttraumatic brain edema. *Acta Neurochir Suppl* 76: 171-175, 2000.

73. **Stover JF, Dohse NK and Unterberg AW.** Significant reduction in brain swelling by administration of nonpeptide kinin B2 receptor antagonist LF 16-0687Ms after controlled cortical impact injury in rats. *J Neurosurg* 92: 853-859, 2000.
74. **Tamura A, Graham DI, McCulloch J and Teasdale GM.** Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 53-60, 1981.
75. **Tamura A, Graham DI, McCulloch J and Teasdale GM.** Focal cerebral ischaemia in the rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by [14C]iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 61-69, 1981.
76. **The International Stroke Trial (IST).** A randomised trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19435 patients with acute ischaemic stroke. International Stroke Trial Collaborative Group. *Lancet* 349: 1569-1581, 1997.
77. **Wahl M, Whalley ET, Unterberg A, Schilling L, Parsons AA, Baethmann A and Young AR.** Vasomotor and permeability effects of bradykinin in the cerebral microcirculation. *Immunopharmacology* 33: 257-263, 1996.

78. **Walker K, Perkins M and Dray A.** Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochem Int* 26: 1-16, 1995.
79. **Wardlaw JM.** Overview of Cochrane thrombolysis meta-analysis. *Neurology* 57: S69-S76, 2001.
80. **Zausinger S, Baethmann A and Schmid-Elsaesser R.** Anesthetic methods in rats determine outcome after experimental focal cerebral ischemia: mechanical ventilation is required to obtain controlled experimental conditions. *Brain Res Brain Res Protoc* 9: 112-121, 2002.
81. **Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen H and Schmid-Elsaesser R.** Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms. *Brain Res* 863: 94-105, 2000.
82. **Zausinger S, Lumenta DB, Pruneau D, Schmid-Elsaesser R, Plesnila N and Baethmann A.** Effects of LF 16-0687 Ms, a bradykinin B(2) receptor antagonist, on brain edema formation and tissue damage in a rat model of temporary focal cerebral ischemia. *Brain Res* 950: 268-278, 2002.
83. **Zhao Q, Memezawa H, Smith ML and Siesjo BK.** Hyperthermia complicates middle cerebral artery occlusion induced by an intraluminal filament. *Brain Res* 649: 253-259, 1994.

12 LEBENSLAUF

Allgemeine Angaben

Benjamin Kläsner

Geburtstag und -ort: 25.10.1976 in München

Familienstand: verheiratet

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

1983 – 1987 Grundschule Forstenried, München

1987 – 1996 Thomas Mann – Gymnasium, München

07/96 Abitur (LK Mathematik und Physik)

1996 – 1997 Zivildienst in der Wolfahrt Klinik, Gräfelfing

1997 – 1999 Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig

09/99 Physikum

1999 – 2004 Studium der Humanmedizin an der LMU-München

09/00 1.Staatsexamen

04/03 2.Staatsexamen

11/04 3.Staatsexamen und Approbation

Seit 03/2005: Assistenzarzt am Institut für Nuklearmedizin im Klinikum rechts der Isar, München

Sprachkenntnisse**Computerkenntnisse**

| | | |
|-------------|------------------------------|----------------------------|
| Deutsch | Muttersprache | Microsoft Office |
| Englisch | fließend in Wort und Schrift | Adobe Creative Suite |
| Französisch | Grundkenntnisse | Sigma Plot 8.0, Sigma Stat |
| | | Internet |

Extrakurrikuläre Tätigkeiten

Seit 2001 Erstellen, Präsentation und Kundenbetreuung von www.univadis.de auf
medizinischen Fachkongressen

Auftraggeber: *MSD Sharp & Dhome*, München – Haar

13 DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich in erster Linie bei Herrn Prof. Dr. med. N. Plesnila für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe für „Experimentelle Neurochirurgie“ am Institut für Chirurgische Forschung der LMU – München, für das Überlassen der Doktorarbeit und für die exzellente Betreuung, die ich unter seiner Führung sehr genoss. Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Serge Thal sowohl für die Einführung in die Geheimnisse der Rattenmikrochirurgie als auch für die Unterstützung während der Durchführung der Arbeit. Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Veronika Bischoff, die sich als MTA unserer Arbeitsgruppe weit über das übliche Maß hinaus für das Projekt engagierte und bei einem Großteil der Auswertung einen entscheidenden Beitrag leistete.

Während meiner Zeit am ICF konnte ich nicht nur in einer ausgezeichneten Arbeits-Umgebung wissenschaftliches Forschen lernen, auch die freundliche Arbeitsatmosphäre und der Teamgeist trugen zur Motivation und Arbeitsfreude bei.

Stellvertretend gilt dieser Dank dem gesamten Neuroteam.

Ganz besonders bedanken möchte ich auch bei meiner Frau Karen und meinen Eltern Jane und Erwin Kläsner für die Unterstützung, die sie mir während der gesamten Zeit gaben und mich immer wieder in schwierigen Situationen neu motivierten.